

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KADMİYUM, KURŞUN VE CİVANIN
İNEK LUTEAL HÜCRE KÜLTÜRÜNDE PROGESTERON
SENTEZİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Fatih Sultan BİLMEN

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof.Dr. Şevket ARIKAN**

2015 – KIRIKKALE

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KADMİYUM, KURŞUN VE CİVANIN
İNEK LUTEAL HÜCRE KÜLTÜRÜNDE PROGESTERON
SENTEZİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Fatih Sultan BİLMEN

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof.Dr. Şevket ARIKAN

Bu proje Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri

Birimi'nce desteklenmiştir. Proje no: 2015/69

2015 – KIRIKKALE

Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Fizyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 24/12/2015

Prof. Dr. Hakan KALENDER
Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Üye

Prof. Dr. Feyyaz ÖNDER
Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri MYO
Üye

Prof. Dr. Nazmi ÇETİN
Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Üye

Yrd. Doç. Dr. Özkan ŞİMŞEK
Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Üye

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
İçindekiler	III
Önsöz	VII
Simgeler ve Kısaltmalar	IX
Şekiller	XII
Çizelgeler	XV
ÖZET	1
SUMMARY	3
1. GİRİŞ	5
1.1. İneklerde Östrüs Siklusu ve Ovaryum Fizyolojisi	5
1.1.1. Östrüs Siklusunun Safhaları ve Hormonal Mekanizması	5
1.1.1.1. Proöstrüs	6
1.1.1.2. Östrüs	7
1.1.1.3. Metöstrüs	7
1.1.1.4. Diöstrüs	8
1.1.2. Oogenez	8
1.1.3. Folikülogenez	10
1.1.3.1. İneklerde Foliküler Dalgalanma	13
1.1.4. Korpus Luteum	15
1.1.4.1. Korpus Luteumun Oluşumu	15
1.1.4.2. Hücre Tipleri	16
1.1.4.3. Korpus Luteumun Regresyonu	16
1.1.5. Progesteron	17

1.1.6. Luteal Progesteron Sentezi	18
1.1.6.1. Kolesterol Kaynakları	19
1.1.6.2. Kolesterolün Hücreye Giriş Yolları	19
1.1.6.3. Kolesterolün Mitokondriye Transportu	20
1.1.6.4. Kolesterolün Progesterona Dönüşümü	21
1.2. Ağır Metaller	21
1.2.1. Kadmiyum	23
1.2.1.1. Kadmiyumun Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	23
1.2.1.2. Kadmiyumun Kullanım Alanları	23
1.2.1.3. Kadmiyuma Maruziyet	24
1.2.1.4. Kadmiyumun Toksik Etkileri	25
1.2.1.5. Kadmiyumun Dişi Üreme Sistemi Üzerine Etkisinin Araştırıldığı Çalışmalar	26
1.2.2. Kurşun	30
1.2.2.1. Kurşunun Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	30
1.2.2.2. Kurşunun Kullanım Alanları	31
1.2.2.3. Kurşuna Maruziyet	31
1.2.2.4. Kurşunun Toksik Etkileri	33
1.2.2.5. Kurşunun Dişi Üreme Sistemi Üzerine Etkisinin Araştırıldığı Çalışmalar	34
1.2.3. Cıva	36
1.2.3.1. Cıvanın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	36
1.2.3.2. Cıvanın Kullanım Alanları	37
1.2.3.3. Cıvaya Maruziyet	37
1.2.3.4. Cıvanın Toksik Etkileri	38

1.2.3.5. Cıvanın Dişi Üreme Sistemi Üzerine Etkisinin Araştırıldığı Çalışmalar	39
2. GEREÇ VE YÖNTEM	40
2.1. Araç ve Gereçler	40
2.1.1. Kullanılan Cihazlar	40
2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	41
2.1.3. Kullanılan Diğer Sarf Malzemeler	42
2.2. Yöntem	43
2.2.1. Deney Öncesi Yapılan Hazırlıklar	43
2.2.2. Doku Seçimi	44
2.2.3. Luteal Hücrelerin İzolasyonu	45
2.2.3.1. İzolasyon İçin Dokunun Hazırlanması	45
2.2.3.2. Medyum Hazırlanması ve Hücre İzolasyonu	46
2.2.4. Hücrelerin Sayımı	47
2.2.5. İnkübasyon Sırasında Hücrelere Uygulanacak Ağır Metal Dozlarının Hazırlanması	49
2.2.6. Hücrelerin İnkübasyonu	50
2.2.7. Hormon Analizi	52
2.2.8. İstatistiksel Analiz	52
3. BULGULAR	53
3.1. Hücre Boyaması	53
3.2. Hormon Analizi Bulguları	57
3.2.1. Kadmiyum Klorürün Steroid Sentezi Üzerine Etkisi	58
3.2.2. Kurşun Asetat Trihidratın Steroid Sentezi Üzerine Etkisi	61
3.2.3. Cıva Klorürün Steroid Sentezi Üzerine Etkisi	64

4. TARTIŞMA VE SONUÇ	68
KAYNAKLAR	76
ÖZGEÇMİŞ	89

ÖNSÖZ

Çevre kirliliği, günümüzde endüstriyel gelişmeler nispetinde önemli boyutlara ulaşmıştır. Çevre kirliliğine sebep olan faktörlerin arasında, ağır metallerin, özellikle de kadmiyum, kurşun ve cıvanın önemli payı vardır. Bu metallerin sağlık üzerine birçok zararlı etkisinin olduğu bilinmesine rağmen; alternatifinin olmaması, yasal düzenlemelerin yetersiz oluşu gibi nedenlerle hala yaygın şekilde kullanılması önemli bir gerçektir.

Bu çalışmada kadmiyum, kurşun ve cıvanın in-vitro olarak luteal hücrelerde steroid sentezine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Tarafımızca yapılan literatür taramalarında, bu metallerin üreme fizyolojisinde önemli fonksiyonlara sahip steroid yapıdaki hormonların sentezi üzerine etkisinin araştırıldığı az sayıda çalışmaya rastlanılmıştır. Ancak bu metallerin inek luteal hücre kültüründe steroid sentezine etkisi hiç çalışılmamıştır. Bu yönleriyle, mevcut araştırmanın inek luteal hücresinde ilk kez çalışılmış olması, ayrıca çevre kirliliği ve üreme problemleri gibi güncel konular kapsamında planlanmış olması, çalışmayı özgün ve referans değeri yüksek kılacaktır.

Doktora eğitimim boyunca hayata ve fizyolojiye dair engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, çalışmalarımızda gösterdiği azim ve kararlılığı hususunda rehber edindiğim, kendisiyle çalışmanın bir ayrıcalık olduğunu düşündüğüm, ayrıca hoşgörü ve sabrına hayran kaldığım kıymetli danışman hocam, Prof. Dr. Şevket ARIKAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışma hayatımda ve doktora eğitimimde hiçbir konuda bilgisini esirgemeyen, bana her alanda destek ve güven veren, çok değerli zamanlarını benim için ayırabilen değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Özkan ŞİMŞEK ve Doç. Dr. Nurgül ATMACA'ya, tezimin istatistiksel analizlerinde yardımını esirgemeyen kıymetli hocam Doç. Dr. Serkan ERAT'a, akademik hayatımda engin bilgi ve deneyimlerinden istifade ettiğim Prof. Dr. A. Arzu YİĞİT, Prof. Dr. Hakan KALENDER ve Doç. Dr. Miyase ÇINAR'a, çalışmalarımnda bana her konuda destek olan çalışma arkadaşım Araş. Gör. Ruhi KABAKÇI'ya ve oluşturdukları sıcak ve samimi ortamla, beni motive eden ve

gayrete getiren araştırma görevlisi arkadaşlarıma ayrı ayrı teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Tezimin yazım aşamasında, geç saatlere kadar çalışıp eve geç dönmemi anlayışla ve sabırla karşılayan, bana çalışma hayatımda destek olan, güven veren ve manevi manada hep yanımda olan sevgili eşim Büşra BİLMEN'e ve beni sürekli arayarak özlemine dile getirip teze yoğunlaşmamı sağlayan ve beni gayrete getiren biricik kızım Meryem Ebrar BİLMEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Destekleri ve dualarıyla her zaman yanımda olan, bana duydukları güvenle beni motive eden sevgili annem Duygu BİLMEN ve ablam Ayşenur BİLMEN'e, tez yazım dönemimde yaptıkları organizasyonlarla eşim ve kızımı mutlu edip benim çalışmamı mümkün kılan kayınvalidem Sibel PEKDOĞAN'a, çalışma azmiyle ve yaşantısıyla örnek aldığım kayınpederim Ramazan PEKDOĞAN'a ve son olarak hayatımda maddi manevi destek olan bütün aile büyüklerime, ayrı ayrı teşekkür eder ellerinden öperim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde işareti
/	Bölu işareti
° C	Santigrat derece
µm	Mikrometre
mm	Milimetre
mm ²	Milimetre kare
Ov	Ovülasyon
ng	Nanogram
ml	Mililitre
g	Gram
cm ³	Santimetreküp
mg	Miligram
kg	Kilogram
ppm	Milyonda bir birim
dl	Desilitre
µg	Mikrogram
µM	Mikromol
UV	Ultraviyole
Ca	Kalsiyum
Cd	Kadmiyum
Pb	Kurşun
Hg	Cıva
HgS	Cıva Sülfür
MeHg	Metil Cıva

LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
PKA	Protein Kinaz A
scc	Yan zincir bölünmesi
StAR	Steroidojenik akut regülatör
PBR	preriferal tip benzodiazepin reseptör
PGF ₂ α	Prostaglandin F ₂ α
GnRH	Gonotropin salgılatıcı hormon
FSH	Folikül uyarıcı hormon
LH	Luteinleştirici hormon
3 β –HSD	3 β hidroksi steroid dehidrogenaz
CE	Kolesterol esteraz
ACAT	Açıl koenzim A transferaz
PKC	Protein kinaz C
PIP2	Fosfatidilinositol 4.5- bifosfat
cAMP	Siklik adenzin monofosfat
PLC	Fozfolipaz C
DAG	Diaçilgliserol
PVC	Polivinil klorür
HCG	İnsan koryonik gonadotropin hormon
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
WHO	Dünya sağlık organizasyonu
IARC	Uluslararası kanser araştırmaları ajansı
UNEP	Birleşmiş milletler çevre programı
IPCS	Uluslararası kimyasal güvenlik programı

IGF-1	İnsülin benzeri büyüme faktörü 1
LHRH	Luteinizan hormon salgılatıcı hormon
PMSG	Gebe kısrak serum gonadotropini

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. İneklerde östrüs siklusu boyunca meydana gelen hormonal değişimler (Hopkins 1989).

Şekil 1.2. İneklerde östrüs siklusunun safhaları.

Şekil 1.3. Oogenezis (Marieb 2005).

Şekil 1.4. Ovaryumda, folikül ve korpus luteum gelişiminin şematik gösterimi (Marieb 2005).

Şekil 1.5. İnek ovaryumunda gelişen foliküllerin gösterimi (Braw-Tal ve Yossefi 1997).

Şekil 1.6. Foliküler büyüme sırasında, genişleyen antrumun ve granuloza hücrelerinin kapladığı alanın gösterimi (Lussier ve ark. 1987).

Şekil 1.7. İki ovulasyon arasında meydana gelen iki foliküler dalgalanmanın gösterimi (Adams ve ark. 2008).

Şekil 1.8. İki ovulasyon arasında meydana gelen üç foliküler dalgalanmanın gösterimi (Adams ve ark. 2008).

Şekil 1.9. Steroid hormonların kimyasal yapısı ve sentezlenme yolları (Erickson ve ark. 2004).

Şekil 1.10. Luteal hücrede progesteron sentezinin şematik gösterimi (Niswender 2002).

Şekil 2.1. Ovaryum ve korpus luteumun görünümü.

Şekil 3.1. İnkübasyon öncesi boyanmış luteal hücrelerin görüntüsü (X20).

Şekil 3.2. İnkübasyonun birinci gününde kontrol grubuna ait hücrelerin, kültür pleyti tabanında boyanmış görüntüsü (X20).

Şekil 3.3. İnkübasyonun üçüncü gününde kontrol grubuna ait hücrelerin, kültür pleyti tabanında boyanmış görüntüsü (X20).

Şekil 3.4. İnkübasyon bitiminde (5. Gün) kontrol grubuna ait hücrelerin, kültür pleyti tabanında boyanmış görüntüsü. (X20).

Şekil 3.5. İnkübasyon bitiminde (5. Gün) yüksek doz (1 μM) kadmiyum grubuna ait hücrelerin, kültür pleyti tabanında boyanmış görüntüsü (X20).

Şekil 3.6. İnkübasyon bitiminde (5. Gün) yüksek doz (50 μM) kurşun grubuna ait hücrelerin, kültür pleyti tabanında boyanmış görüntüsü (X20).

Şekil 3.7. İnkübasyon bitiminde (5. Gün) yüksek doz (10 μM) cıva grubuna ait hücrelerin, kültür pleyti tabanında boyanmış görüntüsü (X20).

Şekil 3.8. Kadmiyum klorürün luteal hücrelerde progesteron sentezine etkisinin araştırıldığı birinci deneme sonuçları.

Şekil 3.9. Kadmiyum klorürün luteal hücrelerde progesteron sentezine etkisinin araştırıldığı ikinci deneme sonuçları.

Şekil 3.10. Kadmiyum klorürün luteal hücrelerde progesteron sentezine etkisinin araştırıldığı üçüncü deneme sonuçları.

Şekil 3.11. Kadmiyum klorürün luteal hücrelerde progesteron sentezine etkisinin araştırıldığı dördüncü deneme sonuçları.

Şekil 3.12. Kadmiyum klorürün luteal hücrelerde progesteron sentezine etkisinin araştırıldığı dört denemenin ortalama sonuçları.

Şekil 3.13. Kurşun asetat trihidratın luteal hücrelerde progesteron sentezine etkisinin araştırıldığı birinci deneme sonuçları.

Şekil 3.14. Kurşun asetat trihidratın luteal hücrelerde progesteron sentezine etkisinin araştırıldığı ikinci deneme sonuçları.

Şekil 3.15. Kurşun asetat trihidratın luteal hücrelerde progesteron sentezine etkisinin araştırıldığı üçüncü deneme sonuçları.

Şekil 3.16. Kurşun asetat trihidratın luteal hücrelerde progesteron sentezine etkisinin araştırıldığı dördüncü deneme sonuçları.

Şekil 3.17. Kurşun asetat trihidratın luteal hücrelerde progesteron sentezine etkisinin araştırıldığı dört denemenin ortalama sonuçları.

Şekil 3.18. Cıva klorürün luteal hücrelerde progesteron sentezine etkisinin araştırıldığı birinci deneme sonuçları.

Şekil 3.19. Cıva klorürün luteal hücrelerde progesteron sentezine etkisinin araştırıldığı ikinci deneme sonuçları.

Şekil 3.20. Cıva klorürün luteal hücrelerde progesteron sentezine etkisinin araştırıldığı üçüncü deneme sonuçları.

Şekil 3.21. Cıva klorürün luteal hücrelerde progesteron sentezine etkisinin araştırıldığı dördüncü deneme sonuçları.

Şekil 3.22. Cıva klorürün luteal hücrelerde progesteron sentezine etkisinin araştırıldığı dört denemenin ortalama sonuçları.

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. İnek korpus luteumunda östrüs siklusu boyunca meydana gelen morfolojik değişiklikler (Ireland ve ark. 1980).

Çizelge 2.2. Kültür ortamına uygulanan metaller ve dozları.

**KADMİYUM, KURŞUN VE CIVANIN
İNEK LUTEAL HÜCRE KÜLTÜRÜNDE PROGESTERON
SENTEZİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

ÖZET

Günümüzde çevre kirliliği problemi, yüzleşmek zorunda kaldığımız en önemli küresel meselelerden biridir. Canlılar üzerinde oluşturdukları zararlı etkilerinden dolayı ağır metaller, çevre kirliliğine yol açan maddeler arasında zikredilmektedir. Kadmiyum, kurşun ve cıva, insan ve hayvan sağlığı için tehdit oluşturan en önemli ağır metallerdir. Mevcut çalışma, inek korpus luteum dokusundan izole edilen luteal hücrelerin in vitro inkübasyonu sırasında sentezledikleri progesteron üzerine kadmiyum, kurşun ve cıvanın etkilerinin araştırılması amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Mezbahada kesilen hayvanlardan toplanan ve üzerinde midluteal dönem korpus luteum bulunduran ovaryumlar, soğuk zincir şartlarında laboratuvara ulaştırıldı. Luteal doku aseptik şartlar korunarak ovaryumlardan diseke edildi. Küçük parçalara dilimlenmiş luteal dokular, içerisine bovine serum albumin (2,5 mg/ml), DNA'az (0,04 mg/ml), kollejenaz (0,2 mg/ml) ve antibiyotik/antimikotik (%1) ilavesi yapılmış ve oksijene doyurulmuş medyum (DMEM/F12, 1:1) içerisinde, 37 °C'ye sabitlenmiş çalkalamalı su banyosunda inkübasyona tabi tutuldu. Steroidojenik aktiviteye sahip hücrelerin belirlenmesi, 3 β -hydroxysteroid degydrogenase (3 β -HSD) enzimi aktivitesine bağlı olarak hücrelerin boyanmasıyla gerçekleştirildi. 3 β -HSD aktivitesi bakımından pozitif hücreler (2x10⁴ hücre/kuyucuk) kültür medyumunu (2 ml/kuyucuk) içerisinde 5 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. İlk 24 saat hücreler, %8 oranında newborn calf serum (NCS) içeren medyumda, herhangi bir uygulamaya tabi tutulmaksızın inkübe edildi. Ardından hücreler, içinde serum bulundurmayan ancak belirli miktarlarda kadmiyum klorür (0,1 μ M; 0,25 μ M; 0,5 μ M, 1 μ M), kurşun asetat trihidrat (0,1 μ M; 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M) ve cıva klorür (1 μ M; 2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M) bulunduran kültür medyumunu içinde, toplamda 96 saat daha inkübe edildi. Her 48 saatte bir kullanılmış medyum toplanarak -20 °C saklandı ve yerine

yenisi dağıtıldı. Kullanılmış medyumdaki progesteron miktarının tayini radioimmunoassay (RIA) yöntemiyle gerçekleştirildi.

İnkübasyon medyumuna kadmiyum klorür (0,1 μ M; 0,25 μ M; 0,5 μ M, 1 μ M), kurşun asetat trihidrat (1 μ M, 10 μ M, 50 μ M) ve cıva klorür (2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M) ilave edildiğinde, luteal progesteron sentezinin önemli derecede ($P<0,01$) düştüğü belirlendi. Hücrelerin 1 μ M kadmiyum klorür ile inkübasyonunda, 5. gün ölçümlerinde, progesteron sentezinin %55 oranında azaldığı tespit edildi. Hücrelere 50 μ M kurşun asetat trihidrat uygulandığında inkübasyonun 3. gününde %43 ve 5. gününde %61 oranında progesteron miktarında düşüş gözlemlendi. Hücreler 10 μ M cıva klorür ile inkübe edildiğinde ise, inkübasyonun 3. gününde %42 ve 5. gününde %54 oranında steroid sentezinin azaldığı belirlendi.

Luteal hücre kaynaklı progesteron sentezi üzerine ağır metal etkilerinin araştırıldığı çalışmalar yok denecek kadar az sayıdadır. Mevcut bilgilerimize göre bu çalışma kadmiyum, kurşun ve cıvanın inek luteal hücre steroidogenezisi üzerine etkilerinin araştırıldığı ilk çalışma olma niteliği taşımaktadır. Bu tez çalışması, luteal hücrelerin çok düşük dozlarda bile kadmiyum (0,1 μ M), kurşun (1 μ M) ve cıva (2,5 μ M) gibi ağır metallere maruziyetinde, luteal steroidogenezisin olumsuz yönde etkilendiğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Ağır metal, Kadmiyum, Kurşun, Cıva, Luteal hücre, Progesteron, Hücre kültürü, 3 β -HSD

**EFFECTS OF CADMIUM, LEAD AND MERCURY
ON PROGESTERONE SYNTHESIS IN CULTURED
BOVINE LUTEAL CELLS**

SUMMARY

Environmental pollution is one of the most important issues that world is facing today. Heavy metals are mentioned among the environmental pollutants due to their harmful effects on living organism. Cadmium, lead and mercury are the most important heavy metals threatening animals and human health. The present study was carried out to investigate in vitro effects of cadmium, lead and mercury on progesterone synthesis by luteal cells isolated from bovine corpora luteal.

Midluteal corpora lutea were collected from a local abattoir and transported to the laboratory in a cold chain. Luteal tissues were dissected from ovary in aseptic condition. After mincing into small pieces, minced tissues were dissociated into cells in aerated (O₂) culture media (DMEM/F12, 1:1) containing bovine serum albumin (2.5 mg/ml), collagenase (0.2 mg/ml), DNase (0.04 mg/ml) and antibiotic/antimycotic mixture (1%) on a shaking water bath at 37 °C. Cells having steroidogenic activity were determined by staining cells for 3β-hydroxysteroid dehydrogenase (3β-HSD) activity. Certain number of cells having steroidogenic activity (2x10⁴/well) was incubated in 6 well culture media (2 ml/well) containing newborn calf serum (8%) and antibiotic/antimycotic mixture (%1) for 24 h. After that, luteal cells were incubated with serum free media containing cadmium chloride (0.1 μM, 0.25 μM, 0.5 μM, and 1 μM), lead acetate trihydrate (0.1 μM, 1 μM, 10 μM and 50 μM) and mercury chloride (1 μM, 2.5 μM, 5 μM and 10 μM) for additional 96 hours. Every 48 hours, used media was replaced and stored frozen at -20 °C. Progesterone content in used media was determined by radioimmunoassay (RIA).

The treatment of cells with cadmium chloride (0.1 μM , 0.25 μM , 0.5 μM and 1 μM), lead acetate trihydrate (1 μM , 10 μM and 50 μM) and mercury chloride (2.5 μM , 5 μM and 10 μM) resulted in significant ($P < 0.01$) inhibition of luteal progesterone synthesis. Incubation of cells with 1 μM cadmium chloride lead to 55% decrease in progesterone production on day 5. Treatment of cells with 50 μM lead acetate trihydrate induced 43% and 61% decrease in progesterone synthesis on day 3 and 5 respectively. When cells were treated with 10 μM mercury chloride, it resulted in 42% and 54% inhibition in progesterone synthesis on day 3 and 5 respectively.

There is lack of studies focused on the effect of heavy metals on luteal steroidogenesis. This is the first study, to our knowledge, to test the effects of cadmium, lead and mercury on progesterone biosynthesis by bovine luteal cells. The results of the present thesis demonstrated that luteal steroidogenesis is greatly influenced by exposure of cells to heavy metals as low as 0.1 μM , 1 μM and 2.5 μM cadmium, lead and mercury respectively.

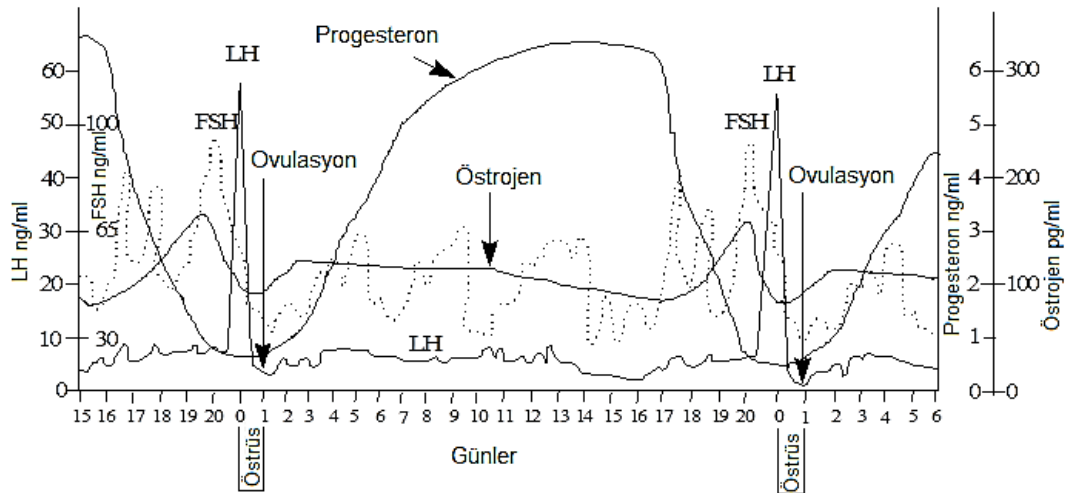
Keywords: Heavy metal, Cadmium, Lead, Mercury, Luteal cells, Progesterone, Cell culture, 3 β -HSD

1. GİRİŞ

1.1. İneklerde Östrüs Siklusu ve Ovaryum Fizyolojisi

1.1.1. Östrüs Siklusunun Safhaları ve Hormonal Mekanizması

İneklerde puberta, ırklar arasında farklılık göstermekle beraber ortalama 9-18 aylık yaşta başlar. İnekler yıl boyu östrüs gösteren poliöstrik hayvanlardır (Alaçam 2007). Östrüs siklusu boyunca kandaki üreme hormonlarının seviyelerinde geçici değişiklikler meydana gelmektedir (Şekil 1.1). Bu değişiklikler sayesinde kızgınlık davranışları sergilenmekte ve üreme meydana gelebilmektedir. İneklerde östrüs siklusu ortalama 21 gün sürmekte olup proöstrüs, östrüs, metöstrüs ve diöstrüs olmak üzere 4 evreden oluşmaktadır. Östrüs siklusu, ovaryumda meydana gelen morfolojik değişikliklere göre foliküler aktivitenin olduğu foliküler dönem ve korpus luteumun var olduğu luteal dönem olarak iki dönemi kapsamaktadır. Foliküler dönem östrüs ve proöstrüs evrelerini kapsarken, luteal dönem metöstrüs ve diöstrüs evrelerini kapsamaktadır (Rathbone ve ark. 2001).

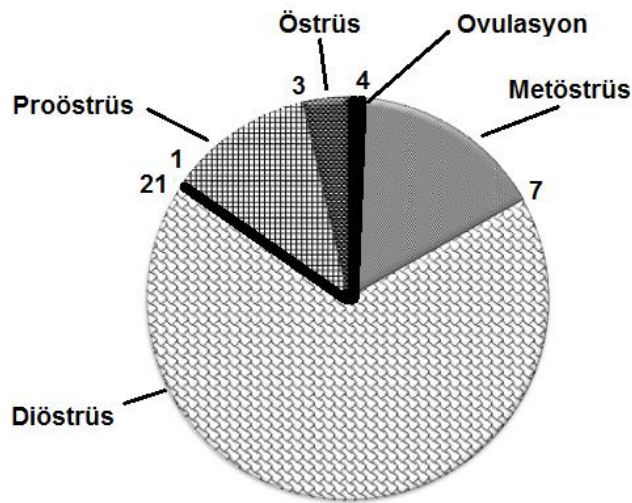


Şekil 1.1. İneklerde östrüs siklusu boyunca meydana gelen hormonal değişimler (Hopkins 1989).

1.1.1.1. Proöstrüs

Proöstrüs, östrüs döneminin hemen önceki dönemi olup (Şekil 1.2), 2-3 gün sürmektedir (Alaçam 2007). Bu evrede, uterus endometriyumu tarafından salgılanan Prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α})'nın etkisi sonucu, korpus luteum gerilemeye başlar. Korpus luteumun gerilemesiyle birlikte, bu doku tarafından sentezlenen progesteron miktarı da geriler ve kan progesteron seviyesi önemli derecede düşer. Kan progesteron seviyesinin düşmesi sonucu, progesteronun ön hipofiz ve hipotalamus üzerindeki baskılayıcı etkisi ortadan kalkar ve hipotalamustan gonodotropin salgılatıcı hormon (GnRH) salgılanır. Hipotalamustan salınan GnRH, adenohipofizi uyularak FSH ve LH salınımına sebep olur. Ovaryumlara ulaşan FSH foliküler gelişmeyi uyarır ve gelişen foliküllerden yüksek miktarda östrojen salgılanır (Stumpf ve ark. 1989, Adams ve ark. 2008).

Proöstrüs evresindeki ineklerin hormonal sistemindeki bu değişiklikler sonucu, hayvanlarda bir kısım davranışsal değişikliklerle birlikte, üreme sistemi dokularında morfolojik farklılıklar meydana gelir. Bu evredeki hayvanlar birbirlerinin üzerine atlar, fakat çiftleşmeyi kabul etmezler. Uterusta hacimsel artış, ödematöz tablo ve konjesyon gözlenir. Rektal palpasyon ile ovaryum muayenesinde foliküler büyüme fark edilebilir (Alaçam 2007).



Şekil 1.2. İneklerde östrüs siklusunun safhaları.

1.1.1.2. Östrüs

Östrüs, ineklerin çiftleşmeyi kabul ettiği dönemdir. İneklerde bu evre 12-18 saat (Şekil 1.2) kadar sürmektedir (Alaçam 2007). Bu dönemde kan östrojen miktarı maksimum seviyeye ulaşınca, adenohipofiz negatif feedback ile uyarılar ve FSH salgılanması engellenir. Artan östrojen miktarı aynı zamanda, adenohipofizi pozitif feedback ile de uyararak luteinleştirici hormon (LH) salgılanmasını artırmaktadır. FSH salınımı negatif olarak etkileyen diğer bir faktör ise, granuloza hücreleri tarafından sentezlenen inhibin hormonudur. Hipofizden LH'ın çok yüksek miktarda salgılanması sonucu, folikül son olgunlaşmasını tamamlar ve ovulasyon gerçekleşir (Walters ve ark. 1984, Stumpf ve ark. 1989, Adams ve ark. 2008). İneklerde ovulasyon, östrüsten sonraki metöstrüs döneminde meydana gelmektedir (Rathbone ve ark. 2001).

Bu dönemdeki hayvanlarda gözlenen en belirgin davranış, hayvanların çiftleşmeyi kabul etmesi ve sıklıkla bağırmasıdır. Vulvadan berrak, ipliksi mukus yapıda çara akıntısı gelir. Östrüsteki inekler diğer hayvanların üzerine atlarlar, kendi üzerlerine atlanıldığında ise hareketsiz dururlar (Alaçam 2007, Erickson ve ark. 2004). Bu dönemdeki inekler huzursuz ve oldukça hareketlidir. Proöstrüste gözlenen üreme sistemi dokularındaki morfolojik değişiklikler östrüste daha da artar. Serviks açılmış, uterus konjesyone ve ödemlidir (Alaçam 2007).

1.1.1.3. Metöstrüs

Bu evrede hayvanlardaki çiftleşme isteği sona ermiştir. İneklerde metöstrüs evresi 3-4 gün (Şekil 1.2) sürmektedir (Alaçam 2007). Bu dönemde ovulasyon meydana gelir ve korpus luteum şekillenir. Ovulasyon, östrüsün bitiminden yaklaşık 8-12 saat sonra meydana gelir. Ovulasyondan sonra, ovule olan kısımda bulunan granuloza ve teka hücreleri LH'ın etkisiyle luteinleşir ve korpus luteum oluşmaya başlar (Rathbone ve ark. 2001). Ovulasyondan sonra östrojenin hızlı bir şekilde düşmesi sonucu, endometriumda metöstrüs kanaması olarak bilinen peteşiyel kanamalar

meydana gelir. Bu olay daha çok düvelerde östrüs bitiminden 2-3 gün sonra gözlenir (Alaçam 2007).

1.1.1.4. Diöstrüs

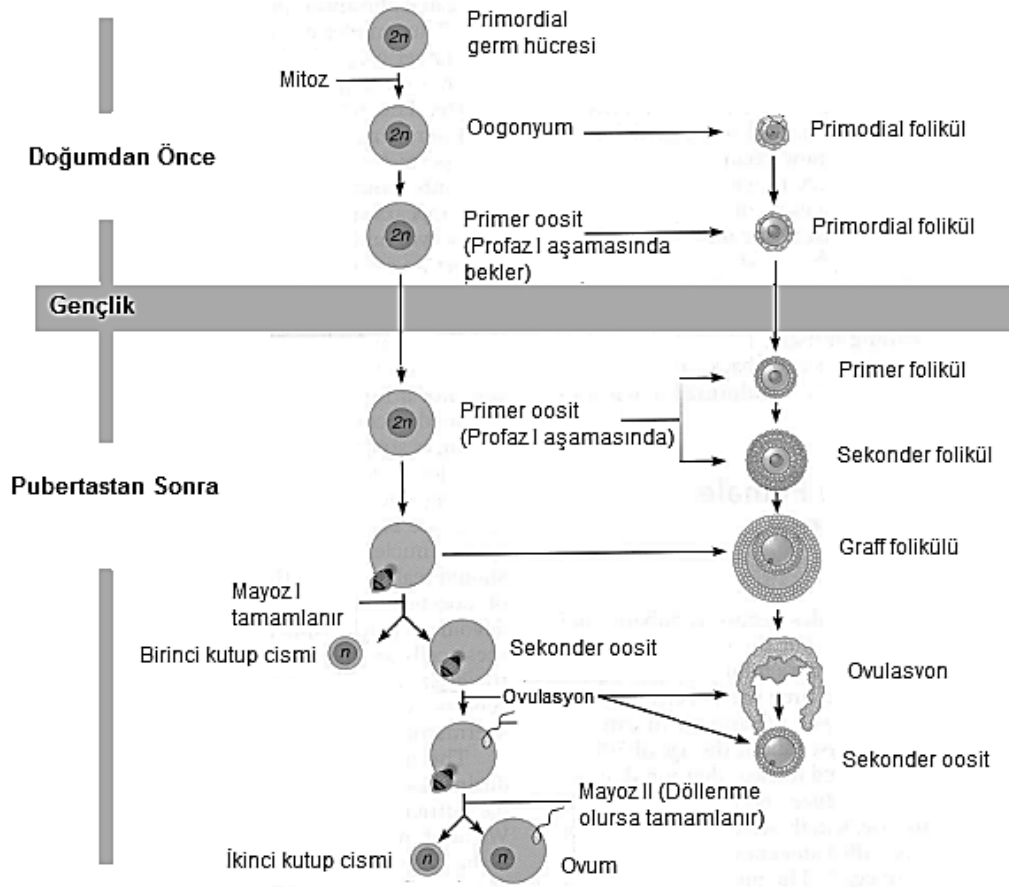
Bu dönem korpus luteumun aktif olduğu dönemdir. İneklerde bu evre 12-16 gün sürer (Şekil 1.2). Diöstrüsün sonlarına doğru korpus luteum maksimum boyuta ulaşır. Korpus luteum tarafından üretilen progesteron, negatif feedback ile hipotalamus ve hipofizi uyararak GnRH, FSH ve LH salınımını inhibe eder. Bunun sonucu ovaryumda yeni bir foliküler gelişim engellenmiş olur. Eğer gebelik şekillenmezse, ovulasyondan 16-17 gün sonra uterus endometriyumu tarafından salgılanan $PGF_2\alpha$ 'nın etkisi sonucu, korpus luteum gerilemeye başlar. Progesteron seviyesinin düşmesiyle hipotalamus ve hipofiz üzerindeki baskılayıcı etki ortadan kalkar ve siklus yeniden başlar (Walters ve ark. 1984, Rathbone ve ark. 2001).

1.1.2. Oogenez

Oositler, vitellüs kesesinin endoderminden, primordial germ hücreleri ismi altında köken alırlar. Primordial germ hücreleri, erken embriyonik dönemde çok sayıda mitoz bölünmeye uğrar. Sonrasında mitoz bölünme durur ve bu evredeki hücreler oogonyum olarak adlandırılırlar. Oogonyumlar, ineklerde gebeliğin 75-80. günlerinde birinci mayoz bölünmeye başlar, fakat bölünme tamamlanmayıp profaz safhasında bekler (Adams ve ark. 2008). Bu aşamadaki hücreler oosit adını alır ve ergenlik çağına kadar beklerler (Şekil 1.3). Doğumdan sonra buzağı ovaryumunda yaklaşık 120 000 kadar oosit bulunmaktadır (Erickson ve ark. 2004).

Pubertasla birlikte ovaryumlarda oosit gelişiminde yeni bir etkinlik başlar. Ovulasyondan evvel birkaç oosit, birinci mayoz bölünmelerini tamamlar ve $2n$ olan kromozom sayısı yarıya iner. Oluşan bu n kromozomlu iki yavru hücreden biri sekonder oosite dönüşmüş, diğeri birinci kutup cismi olarak küçük ve işlevsiz kalmıştır (Marieb 2005). İkinci mayoz bölünme ovulasyondan sonra dölleme olursa

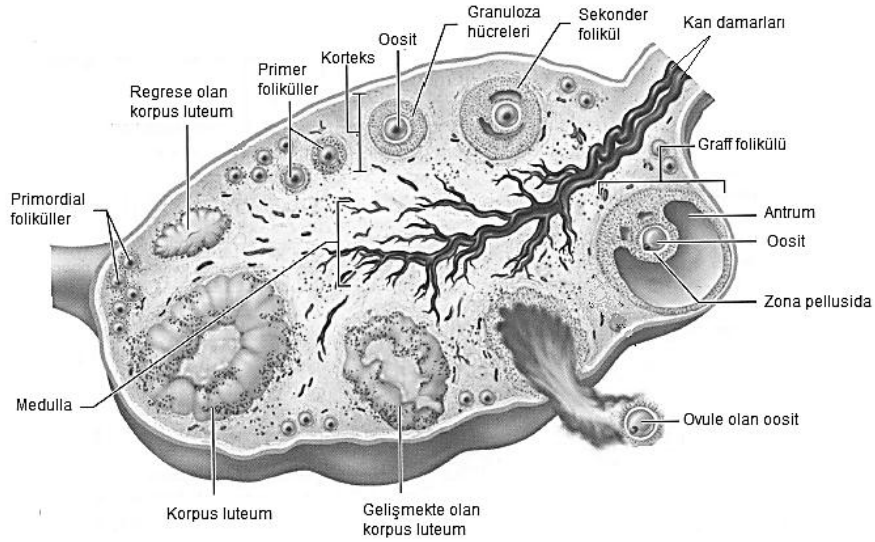
gerçekleşir. İkinci mayoz mitoz benzer ve bölünmenin sonucu olarak oluşan her yavru hücre n kromozom taşır. İkinci mayoz bölünme sonucu oluşan yavru hücrelerden biri sitoplazmanın hemen tümüne sahiptir ki buna ovum denir. Diğer, ikinci kutup cismi olarak küçük ve işlevsizdir. Ovumun sperm ile birleşmesi sonucu $2n$ kromozomlu yeni bir birey meydana gelir (Şekil 1.3). Oogenezin net sonucu, her birincil oositten sadece tek bir ovum meydana gelmesidir (Peters 1970).



Şekil 1.3. Oogenezis (Marieb 2005).

1.1.3. Folikülogenez

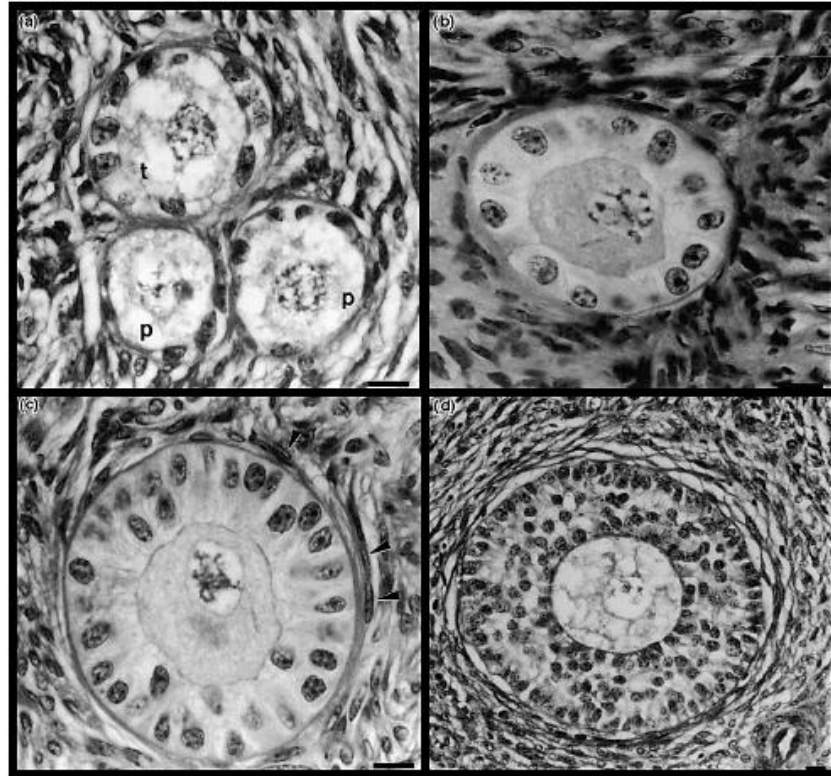
Dişi üreme hücresi (oosit) ovaryumda, folikül içinde bulunur (Şekil 1.4). Oositin gelişimi ve foliküllerin büyümesi eşzamanlı gerçekleşmektedir. Oositi ilk olarak çevreleyen folikül, iç yüzeyi tek katlı yassı epitelle döşenmiş primordial foliküldür (Adams ve ark. 2008). Daha sonra granuloza hücreleri proliferasyona uğrar ve çok katmanlı hale dönüşür. Primordiyal foliküllerin primer, preantral ve antral folikül aşamalarına ilerlemesi gebeliğin son dönemlerinden itibaren gençlik dönemi ile tüm üreme siklusları boyunca devam eder (Eric ve ark. 2013). Pubertadan önce foliküler gelişim belli bir aşamaya kadar devam etmekle birlikte, bu gelişim ovulasyonla sonuçlanmamaktadır (Erickson ve ark. 2004).



Şekil 1.4. Ovaryumda, folikül ve korpus luteum gelişiminin şematik gösterimi (Marieb 2005).

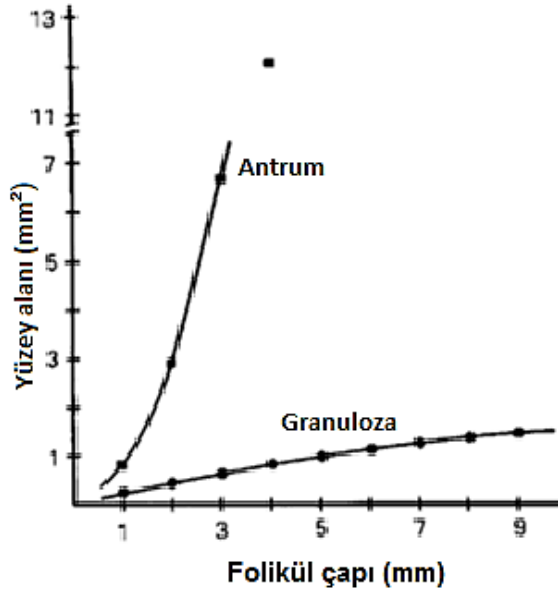
İneklerde küçük foliküllerin gelişimi; primordial folikül, geçici folikül, primer folikül, küçük preantral folikül, büyük preantral folikül ve küçük antral folikül şeklinde klasifiye edilmiştir. Bu klasifikasyonda primordial folikül, oositin yassı granuloza hücreleri ile kuşatıldığı dönem olarak ifade edilmiştir. Folikülün çapı 40 μm 'den küçük, oositin çapı ise 30 μm kadardır. Geçici folikülde, oosit kübik ve yassı granuloza hücreleriyle sarılmıştır. Primer folikülde, oosit bir veya iki sıra kübik

granuloza hücreleri ile kuşatılmıştır. Primer folikülün çapı 40-80 µm iken oositin çapı 31 µm kadardır. Küçük preantral folikülde, oosit iki veya üç granuloza tabakası ile sarılmıştır. Folikülün çapı 80-131 µm, oositin çapı ise 50 µm kadardır. Bu evrede, follükül granuloza hücrelerinin mitozu ile büyürken granuloza hücrelerini kuşatan bağ dokusu hücreleri farklılaşır ve teka adı verilen hücre katmanları oluşur. Büyük preantral folikülde, granuloza katmanı dört veya altı tabakaya ulaşmıştır (Şekil 1.5). Folikülün çapı 131-250 µm, oositin çapı ise 69 µm kadardır (Braw-Tal ve Yossefi 1997). Bu evrede granuloza hücreleri tarafından, oosit ile granuloza hücrelerini birbirinden ayıran zona pellüsida adlı bir tabaka salgılanır. Zona pellüsida, sperm hücresinin ovulasyondan sonra yumurta hücresinin yüzeyine bağlanmasında rol oynayan glikoproteinleri içerir (Eric ve ark. 2013). Küçük antral folikülde granuloza hücre katmanı altıdan fazladır. Folikülün çapı 250-500 µm, oositin çapı ise 92 µm kadardır (Braw-Tal ve Yossefi 1997).



Şekil 1.5. İnek ovaryumunda gelişen foliküllerin gösterimi. (a) İki primordial folikül (p: basık granuloza hücreleri, t: kübik granuloza hücreleri). (b) Primer folikül, oosit tek sıra kübik granuloza hücresi ile sınırlanmış. (c) Küçük preantral folikül, iki sıra granuloza hücresi gözlenmekte. (d) Büyük preantral folikül, 5 sıra granuloza hücresi gözlenmekte (Braw-Tal ve Yossefi 1997).

İneklerde antral folikülün gelişimi iki faz şeklinde değerlendirilmiştir. Birincisi, granuloza hücrelerinin aşırı derece mitotik çoğalması sonucu, granuloza hücre katmanının ve hücre sayısının artmasıdır. İkinci evre, antral folikülün çapının 2-2,5 mm'ye ulaşmasından sonra gözlenir. Bu evrede granuloza hücrelerinin steroidojenik aktivitesi sonucu, folikül antrumu aşırı şekilde genişleyerek (Şekil 1.6) 7-8 mm²'ye ulaşır.



Şekil 1.6. Foliküler büyüme sırasında, genişleyen antrumun ve granuloza hücrelerinin kapladığı alanın gösterimi (Lussier ve ark. 1987).

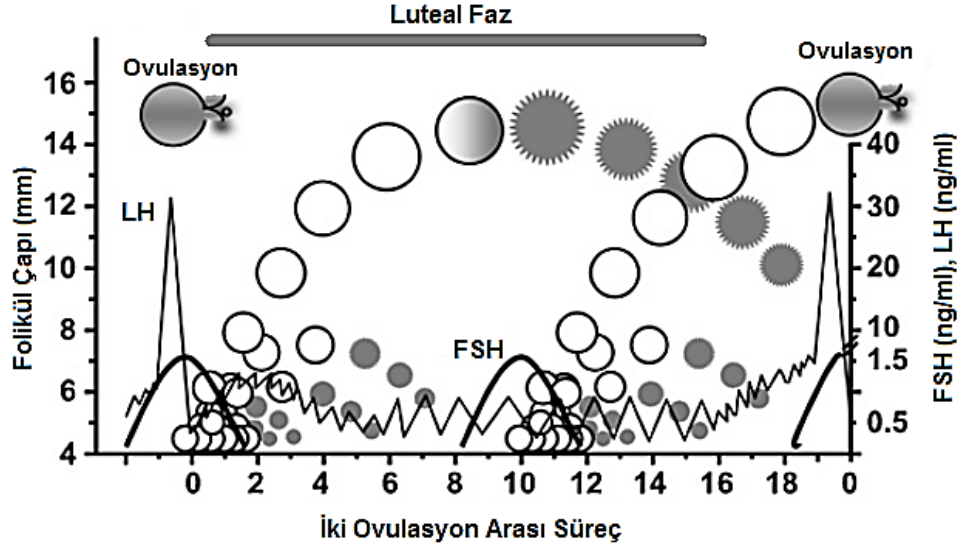
Graaf folikülü, ovulasyondan önce seçilmiş antral folikülün, yani dominant folikülün aşırı büyümesi olgusudur (Şekil 1.4). Bu dönemde granuloza ve teka hücrelerinin artan salguları sonucu, folikülün çapı 12-16 mm'ye ulaşmıştır (Sunderland ve ark. 1994).

1.1.3.1. İneklerde Foliküler Dalgalanma

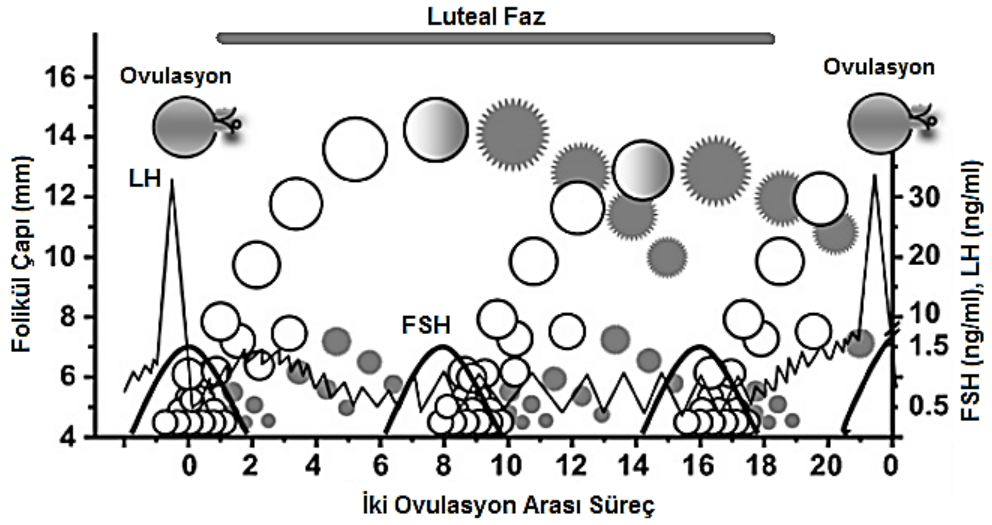
İneklerde foliküler gelişim iki ya da üç dalga şeklinde gerçekleşmektedir. İneklerde östrüs siklusu, iki foliküler dalga (Şekil 1.7) şeklinde gerçekleşmişse 19-20 gün, üç foliküler dalga (Şekil 1.8) şeklinde gerçekleşmişse 21-23 gün sürmektedir. Östrüs siklusu süresince meydana gelen hormonal değişiklikler foliküler gelişimi etkilemektedir. Folikül stimüle edici hormon'un (FSH) konsantrasyonundaki düşüş ve çıkışlar, foliküler dalgalanmayı oluşturmaktadır (Adams ve ark. 2008).

Korpus luteumun gerilemesiyle, kan progesteron miktarının düşmesi sonucu FSH ve LH üzerindeki baskılayıcı etki ortadan kalkar ve iki-üç gün içerisinde 8-41 adet 3-4 mm'lik foliküller ortaya çıkar. Bu foliküllerin en büyükleri dominant folikül olarak kalırken, diğerleri atreziye uğrar. Fakat atretik foliküller bile 8-9 mm çapa ulaşmıştır. Dominant folikül seçiminde FSH ve LH reseptörlerinin önemi vardır. Granuloza hücreleri yalnızca FSH reseptörü barındırırken, teka hücreleri hem FSH hem de LH reseptörü barındırır. Dominant folikül, daha fazla teka hücresine sahip olduğundan, östrojen sentezleyip gelişmeye devam ederken, dominant olmayan folikül düşük FSH konsantrasyonu sebebiyle geriler. Ayrıca bir görüşe göre, dominant folikül diğer foliküllerin gelişimini baskılamaktadır (Adams ve ark. 2008).

Foliküler dönemde, birinci ya da ikinci foliküler dalgalanmanın ovulasyonla sonuçlanmamasının sebebi, korpus luteumun aktif dönemde olmasından dolayıdır. Aktif korpus luteum yüksek miktarlarda progesteron sentezleyerek LH'nin salınımını baskılamakta ve ovulasyonun meydana gelmesini önlemektedir. Korpus luteum regrese olduğu zaman, LH üzerindeki progesteronun baskılayıcı etkisi ortadan kalkar ve foliküler dalgalanma ovulasyonla sonuçlanır (Adams ve ark. 2008).



Şekil 1.7. İki ovulasyon arasında meydana gelen iki foliküler dalgalanmanın gösterimi (Adams ve ark. 2008).



Şekil 1.8. İki ovulasyon arasında meydana gelen üç foliküler dalgalanmanın gösterimi (Adams ve ark. 2008).

1.1.4. Korpus Luteum

Korpus luteum, gebeliğin sürdürülmesinde ve östrüs siklusunun düzenlenmesinde etkin rol alan geçici endokrin bir bezdir. Bu fonksiyonunu sentezlediği progesteron hormonu aracılığıyla yerine getirmektedir. Korpus luteum, ovulasyondan sonra ovule olan graaf folikülünün çeperinde bulunan hücrelerin değişimi ve çoğalmasıyla oluşur (Stocco ve ark. 2007). Gebelik meydana gelirse, korpus luteum aktif olarak progesteron sentezlemeye devam eder. Eğer gebelik şekillenmese, korpus luteum geriler ve sentezlediği progesteron miktarı azalır. Progesteronun kandaki seviyesi düşünce, progesteronun ovaryum üzerindeki baskılayıcı etkisi ortadan kalkar ve yeni sikluslar meydana gelir (Alaçam 2007).

1.1.4.1. Korpus Luteumun Oluşumu

Üreme siklusunun sonlarında, LH reseptörlerinin aktive olması ve LH'nin yüksek düzeyde salınması sonucu graaf folikülü ovulasyona uğrar ve oosit folikülden atılır. Graaf folikülünün çeperinde yer alan granuloza ve teka hücreleri, hipertrofi ve luteinizasyona uğrayarak korpus luteum hücrelerine dönüşür. Birkaç gün içinde korpus hemorajikum gelişir ve ovaryum yüzeyinden taşan bir görünüm alır. Korpus luteum, özellikle büyük luteal hücrelerin hipertrofisi sonucu giderek büyür ve önemli miktarda progesteron üretir (Stocco ve ark. 2007). Bu aşamada, progesteronun etkisiyle LH'nin salınımı hipotalamus üzerinden baskılandığı için, LH'nin kandaki seviyesi %75 oranında azalmıştır.

Eğer gebelik şekillenirse korpus luteum ineklerde gebelik süresince aktif kalıp, progesteron sentezlemeye ve yeni üreme sikluslarını engellemeye devam eder. Gebeliğin oluşmaması durumunda, köpek, kedi ve primat dışındaki hayvanlarda, uterus tarafından sentezlenen $PGF_{2\alpha}$ 'nın etkisi sonucu korpus luteum regrese olur (Alaçam 2007). Regrese olan korpus luteumun progesteron sentezi de geriler ve progesteronun üreme siklusu üzerindeki baskısının ortadan kalkması sonucu, yeni foliküller tekrar gelişmeye başlar (Erickson ve ark. 2004).

1.1.4.2. Hücre Tipleri

Korpus luteum, birçok hücre çeşidini barındıran endokrin bir bezdir. Bu dokunun büyük bir kısmını küçük ve büyük luteal hücreler oluşturmaktadır. Korpus luteum ayrıca fibroblastlar, endotel, perisit ve kan hücrelerini de barındırmaktadır (Stocco ve ark. 2007).

Büyük luteal hücreler, graaf folikülü çeperinin iç kısmındaki granuloza hücrelerinden, küçük luteal hücreler ise graaf folikülü çeperinin dış kısmındaki teka hücrelerinden köken almaktadır. Gebe olmayan ineklerde, küçük luteal hücreler 10-20 µm çapında iken, büyük luteal hücreler 25 µm veya daha büyük çapa sahiptirler (Milvae ve ark. 1996, Yiğit ve Arıkan 2001). Graaf folikülünün çeperinde, luteinizasyona başladığında, steroidojenik hücreler çok kısa sürede farklılaşp hipertrofiye uğrarlar. Büyük luteal hücreler, küçük luteal hücrelerden daha fazla hipertrofiye uğrar ve korpus luteumun oluşumuna daha fazla katkıda bulunurlar. Ruminatlarda progesteron sentezinde, büyük luteal hücreler, küçük hücrelerden 2-40 kat daha fazla progesteron sentezlemektedir (Stocco ve ark. 2007).

1.1.4.3. Korpus Luteumun Regresyonu

Korpus luteum, primatlar hariç çoğu memelide uterus endometriumundan salınan $PGF_2\alpha$ etkisi altında, fonksiyonel ve morfolojik olarak gerilemektedir. İlk olarak progesteronun sentez ve salınımında azalma meydana gelmektedir. Sonrasında ise hücrelerin ölümü sonucu, doku hacminde azalma meydana gelmektedir. Uterus endometriumundan $PGF_2\alpha$ 'nın salınımını uyaran faktörün östrojen olduğu tahmin edilmektedir. Foliküler dönemde artan östrojen sentezi, hipofiz bezinden oksitosin salınımını uyarır. Oksitosin, başlangıçta uterusu uyarak, az miktarda $PGF_2\alpha$ salınımına sebep olur. Ardından $PGF_2\alpha$, pozitif feed back ile oksitosin salınımını artırır. Prostaglandin $F_2\alpha$ 'nın etkisiyle salınan oksitosin, yine uterus endometriumundan $PGF_2\alpha$ 'nın sentez ve sekresyonunu artırarak, luteal dokunun gerilemesini hızlandırır (McCracken ve ark. 1999, Niswender ve ark. 2000).

Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ile korpus luteumun kan akışı arasında bir ilişki söz konusudur. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ korpus luteumun kan akışını azaltarak, dokunun beslenmesini ve steroid sentezi için gerekli maddelerin taşınmasını engellemektedir. Luteal dokunun endotel hücrelerine zarar vererek kapiller damarlarda hasara ve hücre ölümüne yol açmaktadır. Ayrıca, endotel hücrelerden endotelin-1 adı verilen bir faktörün salınmasına da sebep olmaktadır. Endotelin-1, vazokontraktil etkisiyle arteriollerini daraltarak kan akımını azaltmaktadır (Niswender ve ark. 2000).

Prostaglandin $F_{2\alpha}$, hücre içi mekanizmaları da etkilemektedir. Kolesterolün hücreye alımını ve hücre içi taşınmasını azaltmaktadır. Mitokondrial membranın kolesterol geçirgenliğini azaltmaktadır. Luteal hücrelerde LH reseptörlerinin sayısını azaltarak, LH'ın bağlanmasını engellemektedir. Progesteron sentezi için gerekli olan steroidogenik enzimlerin aktivitesini de azaltmaktadır (Mccracken ve ark. 1999, Niswender ve ark. 2000).

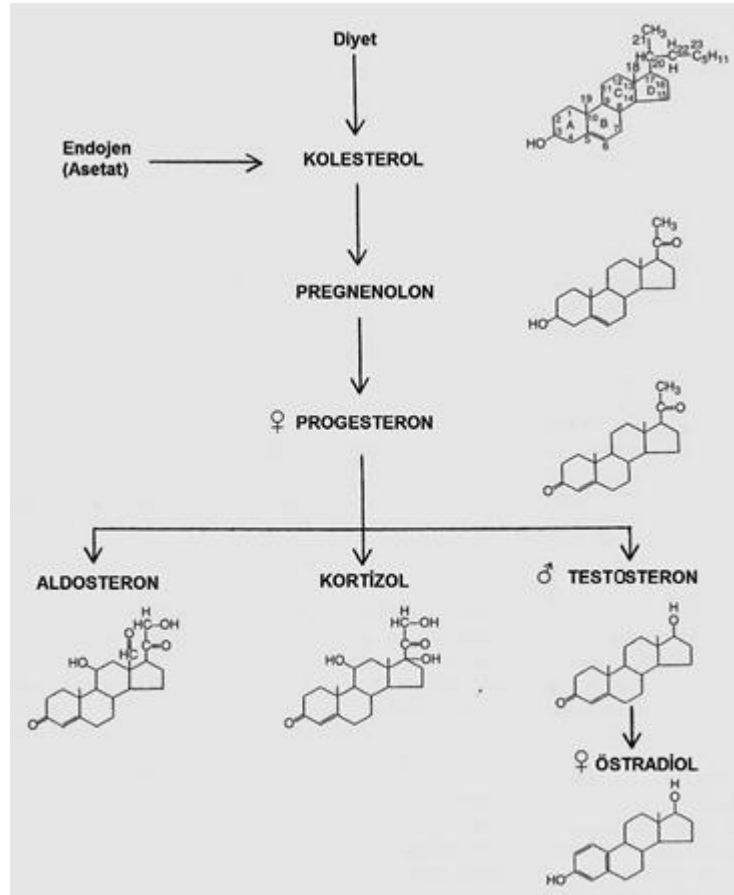
1.1.5. Progesteron

Üreme hormonları içerisinde önemli bir yere sahip olan progesteronun sentezlendiği dokular; korpus luteum ve eğer gebelik şekillenirse plasentadır. Progesteron az miktarda adrenal korteks, testis ve yumurtalıklardaki foliküllerden de sentezlenir (Yılmaz 1999).

Progesteron dişi üreme sisteminde; uterusu, zigotun yerleşmesi ve beslenmesi için hazır hale getirmek, T-lenfositlerin etkisini kaldırarak embriyonun reddedilmesini önlemek, gebelik süresince uterus kaslarının kasılmasını engelleyerek gebeliğin devamını sağlamak, meme bezlerinin gelişmesine katkıda bulunmak ve hipotalamustan GnRH salınımını kısıtlayarak follikül gelişimi ve ovulasyonu engellemek gibi önemli fonksiyonlara sahiptir (Graham ve Clark 1997, Yılmaz 1999).

1.1.6. Luteal Progesteron Sentezi

Steroid hormonların (progesteron, östrojen, testosteron) sentezinde kullanılan hammadde, kolesteroldür (Şekil 1.9). Kolesterol, luteal hücreye alındıktan sonra mitokondriye transfer olur. Kolesterolün mitokondriye girmesinde, steroidojenik akut regülatör (StAR) proteininin görevi vardır. Mitokondri içindeki kolesterol, sitokrom P-450 enzim sistemiyle pregnenolona dönüşür. Son olarak pregnenolon serbest kalarak granülsüz endoplazmik retikulum üzerinde var olan 3β hidroksi steroid dehidrogenaz (3β -HSD) enzimi yardımıyla progesterona dönüşür.



Şekil 1.9. Steroid hormonların kimyasal yapısı ve sentezlenme yolları (Erickson ve ark. 2004).

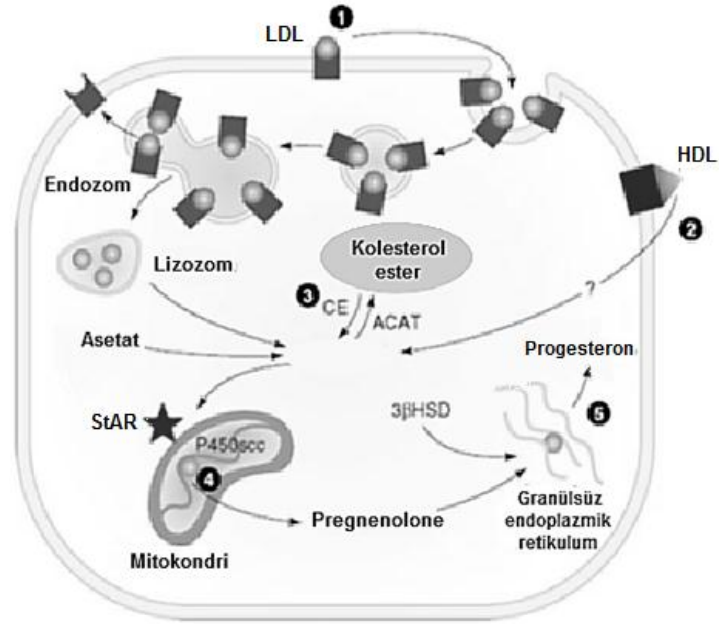
1.1.6.1. Kolesterol Kaynakları

Kolesterolün büyük bir kısmı karaciğerde sentezlenir ve korpus luteum, adrenal korteks, ovaryum folikülleri ve testis gibi steroidojenik aktivite gösteren dokulara lipoprotein formunda transfer olur. Korpus luteum tarafından sentezlenen progesteronun en önemli kolesterol kaynağı, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL)'dir. Ayrıca, depo kolesterol, kolesterol esteraz aracılığıyla hidrolize olmakta ve kolesterol kaynağı olarak kullanılmaktadır (Niswender 2002). Kolesterol yokluğunda ise luteal hücreler asetattan kolesterol sentezleyerek progesteron üretebilmektedir (Cook ve ark. 1967).

1.1.6.2. Kolesterolün Hücreye Giriş Yolları

Ortalama 2500 kolesterol molekülü barındıran LDL, luteal hücrelere reseptör aracılı endositoz yoluyla girmektedir. Sonra LDL, reseptörden ayrılıp yıkımlanır ve serbest kolesterol açığa çıkar. Görevini tamamlayan LDL reseptörleri ya parçalanıp uzaklaştırılır ya da tekrar kullanılmak üzere yeni bir transport siklusuna girer. Hücre içine HDL alınması, HDL bağlayıcı proteinlerin plazma membranına bağlanmasından sonra gerçekleşmektedir (Şekil 1.10'da 1 ve 2 numara). Fakat hücre içerisine kolesterolün nasıl girdiği hala anlaşılammıştır (Niswender 2002).

Hücre içine giren kolesterol; steroid sentezinde, hücre membranının yapımında ve depolanarak değerlendirilebilir. Depo kolesterol, protein kinaz A (PKA)'nın kolesterol esterazı aktive etmesi sonucu hidrolize olmakta ve serbest kolesterol açığa çıkmaktadır (Şekil 1.10' da 3 numara).



Şekil 1.10. Luteal hücrede progesteron sentezinin şematik gösterimi (Niswender 2002).

1.1.6.3. Kolesterolün Mitokondriye Transportu

Kolesterolün progesteron sentezinde kullanılabilmesi için mitokondri içine girmesi hayatidir. Çünkü progesteronun sentez basamaklarından biri olan kolesterolün pregnenolona dönüşümü, sitokrom P-450 enzim sistemiyle mitokondride gerçekleşmektedir (Niswender 2002).

Kolesterolün mitokondri içine girmesinde, mitokondri membranına yerleşmiş StAR proteininin kritik görevi bulunmaktadır (Şekil 1.10'da 4 numara). Bu protein, kolesterolü pregnenolona dönüştürmek üzere mitokondrinin dış membranından iç membranına taşımaktadır (Niswender 2002). Bu konuyla ilgili yapılan bir çalışmada, StAR geninin mutasyonuna neden olan konjenital bir hastalıkta, hastaların adrenal ve gonadal steroid sentezinde ciddi şekilde azalma olduğu gösterilmiştir (Lin ve ark. 1995). Kolesterolün mitokondri içine transportunda StAR proteini haricinde, steroid üreten hücrelerin mitokondri membranlarında var olan periferik tip benzodiazepin reseptörlerinin (PBR)'de görev aldığı bilinmektedir (Papadopoulos

ve Brown 1995). Yapılan bir araştırmada da bu iki protein arasında etkileşim olduğu gösterilmiştir (West ve ark. 2001).

Büyük luteal hücreler, küçük luteal hücrelerden 2-40 kat daha fazla progesteron üretmektedir (Stocco ve ark. 2007). Yapılan çalışmalarda bu farklılığın, büyük luteal hücrelerin daha yüksek konsantrasyonda, endojen endozepin içermesinden kaynaklanabileceği ifade edilmiştir. Endozepinin, PBR'nin yapısında değişiklik yaparak, ya da StAR ile PBR arasındaki etkileşimi kolaylaştırarak, kolesterolün transportunu etkin hale getirdiği düşünülmektedir (Niswender 2002).

1.1.6.4. Kolesterolün Progesterona Dönüşümü

Kolesterol, mitokondriye transfer olduktan sonra, sitokrom P-450 enzim sistemiyle pregnenolona dönüşmektedir. Sonrasında pregnenolon serbest kalıp, granülsüz endoplazmik retikuluma transfer olmaktadır. Son olarak endoplazmik retikulum üzerinde var olan 3β-HSD enzimi vasıtasıyla, pregnenolon progesterona dönüşmektedir (Hanukoğlu 1992, Niswender 2002) (şekil 1.10'da 5 numara).

1.2. Ağır Metaller

Canlıların sağlığını en fazla tehdit eden başlıca ağır metaller; kadmiyum, kurşun ve cıvadır. Son yüzyılda gerçekleşen endüstriyel gelişmeler bu metallerin kullanım miktarını önemli derecede artırmıştır. Ağır metallerin sağlık üzerine birçok zararlı etkisi olduğu bilinmesine rağmen, dünya genelinde yaygın şekilde kullanılmaktadır. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde bu tkretim, çok daha yüksek miktarlardadır (Jrup 2003).

Bu metalleri bu derece önemli kılan ana faktör, biyobirikim göstermeleridir. Fabrika atıklarının gl veya nehirlere tahliye edilmesi, verim artırmak amacıyla pestisitlerin kullanılması, egsoz gazları ve çeşitli endüstriyel faaliyetler sonucu meydana gelen zehirli gazlar, toprak ve hava kirliliğine sebep olmaktadır

(Tchounwou ve ark. 2012). Organik kirleticiler toprakta parçalanıp etkisiz hale gelebilmektedir, fakat ağır metaller için böyle bir durum söz konusu değildir. Bundan dolayı toprakta önemli miktarlarda birikebilmekte ve canlıları doğrudan ya da biyolojik aktarımla dolaylı yoldan etkileyebilmektedir (Wu ve ark. 2010).

Kadmiyum, kurşun ve cıvanın yarılanma ömrü çok düşüktür (Sugita 1978). Bundan dolayı bu metaller, dokularda önemli boyutlarda birikmektedir. Bu birikimde bitkilerde bulunan fitoşelatinler ve memelilerde bulunan metallothioneinlerin önemli rolü vardır. Bu iki protein, esansiyel elementleri bağlayarak bu elementlerin homeostazisinde görev almaktadır. Ancak bu proteinler, ağır metalleride bağlamakta ve bu metallerin dokularda artan miktarlarda birikmesine sebep olmaktadır (Kägi 1991, Cobbett ve Goldsbrough 2002).

Kadmiyum, kurşun ve cıva günlük hayatımızda kullandığımız birçok ürünün imalatına girmekte ve sağlığımızı tehdit etmektedir. Akü, pil, batarya ve değişik elektronik cihazlar, boya ve boyanmış objeler, su kanal ve tesisatları, termometreler ve değişik barometreler, florasan lambalar ve diş tedavisinde kullanılan amalgam, ağır metal maruziyetinde en önemli ürünlerdir (Järup ve ark. 1998, Wang ve ark. 2009). Çeşitli hobi amaçlı tüketim ürünleri ve gıda alışkanlıkları da kadmiyum, kurşun ve cıva maruziyetinde önemlidir. Özellikle sigara ve nargile kullananlar, kadmiyum ve kurşuna daha fazla maruz kalmaktadırlar. Yine alkol kullanımı ve asitli yiyecek ve içecekler, kurşun alımını artırmaktadır. Gıda tüketimine yönelik ağır metal maruziyetinde, balık ve deniz kabukluları önemli görülmektedir. Bu ürünlerde metil cıva yüksek miktarda birikebilmekte ve gıda yoluyla insanlara aktarılabilmektedir. Yine çeşitli tahıllarda ağır metal birikimi yüksek miktarlarda olabileceğinden, tahıl tüketimi ağır metal alımında önemli görülmektedir (WHO 2007, 2010).

1.2.1. Kadmiyum

1.2.1.1. Kadmiyumun Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Kadmiyum (Cd) periyodik çizelgenin II B grubunda yer alan parlak gümüşü beyaz renkli yumuşak bir metaldir. Kadmiyumun atom numarası 48, atom ağırlığı 112,41 ve yoğunluğu 8,64 g/cm³'tür (Schulte-Schrepping ve Piscator 1985, Bradl 2005). Yer kabuğunda 0,15-0,2 mg/kg oranında bulunan kadmiyum, çinko cevherinin ayrıştırılması sırasında yan ürün olarak elde edilmektedir (Wang ve ark. 2009).

1.2.1.2. Kadmiyumun Kullanım Alanları

Kadmiyum, fiziksel olarak yumuşak tabiata sahip olması ve bu sayede kolay şekil verilebilmesi, korozyona karşı mükemmel direnç göstermesi ve erime sıcaklığının düşük olması gibi metal kullanımında önemli özelliklere sahip olduğundan çok yaygın kullanım alanı bulmaktadır. Dünya genelinde yıllık kadmiyum tüketimi 22000 ton civarında olup son yıllarda bu oran giderek artmaktadır (USGS 2015). Kadmiyum en fazla kullanım alanı bulduğu ürün nikel-kadmiyum pilleridir (USGS 2008).

Kadmiyum, oksitlenmeye karşı dayanıklılığı sebebiyle, elektronik ve gemi sanayinde, kaplama materyali olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Scoullou ve ark. 2001). Kadmiyum sülfid bileşikleri renk maddesi olarak plastik, cam, seramik, kauçuk, resim ve havai fişek üretiminde önemli boyutlarda kullanılmaktadır. Kadmiyum, PVC üretiminde de sağlamlık sağlaması amacıyla kullanılmaktadır (Schulte-Schrepping ve Piscator 1985, Wang ve ark. 2009).

1.2.1.3. Kadmiyuma Maruziyet

Kadmiyuma mesleki maruziyet en fazla solunum sistemi yoluyla olmaktadır. Birçok meslek grubu kadmiyuma önemli oranlarda maruz kalabilmektedir. Bu meslek grupları içinde özellikle maden işçileri, boya ve akü fabrikası çalışanları kadmiyumun toz ve dumanına önemli boyutlarda maruz kalmaktadırlar (Järup ve ark. 1998).

Mesleki anlamda kadmiyuma maruziyetten sonra kadmiyuma en fazla maruz kalan sınıf sigara kullananlardır. Bir sigara 1,5-2 µg kadar kadmiyum içermektedir. Bunun yaklaşık %10 sigara dumanına geçmekte ve sigara içme sırasında bu dumanın %50'si akciğerlerden absorbe olmaktadır Günde 20 dal sigara içen bir şahsın vücuduna yaklaşık 1 µg kadar kadmiyum girmektedir (Elinder ve ark. 1976,1983). Yapılan araştırmalarda sigara kullananların kan kadmiyum seviyeleri, kullanmayanlardan 3-4 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Brockhaus ve ark. 1983, Galażyn-Sidorczuk ve ark. 2008). Sigara kullananların dokularında kadmiyum birikme oranı araştırıldığında ise, içmeyenlere oranla kadmiyumun böbrek dokusunda 2-3 kat daha fazla biriktiği gösterilmiştir (Elinder ve ark. 1976, Nilsson ve ark. 1995).

Genel itibariyle canlıların kadmiyuma en fazla maruz kaldığı yol, diyetle alınan su ve gıdalardır. Endüstriyel faaliyetler sonucu açığa çıkan kadmiyum ve bileşiklerinin suya karışması ve çeşitli yollarla tarım arazilerine bu bulaşık suyun ulaşması sonucu toprakta kadmiyum birikim oranı artmaktadır. Bu toprakta yetişen ekin, meyve ve sebzeler kadmiyumu bünyesine almakta ve insanlara ve hayvanlara aktarmaktadır. Yapılan bir araştırmada endüstri bölgeleri civarında bulunan çiftliklerdeki hayvanlardan alınan süt numunelerinde kadmiyum ve kurşun miktarı birkaç kat yüksek bulunmuştur (Patra ve ark. 2008). Diğer bir araştırmada ise Meuse nehrinin taşması sonucu toprakta oluşan ağır metal kirliliği araştırılmış ve sebzelerde kadmiyum, kurşun, çinko ve bakır miktarının yüksek olduğu gözlenmiştir (Albering ve ark. 1999). Bu ve benzeri çalışmalar da görüldüğü üzere, kadmiyum ve diğer

metaller gıdalarda birikim göstermekte ve biyolojik olarak canlıdan canlıya aktarılmaktadır.

1.2.1.4. Kadmiyumun Toksik Etkileri

Kadmiyum, insanlar ve hayvanlar için esassiyel olmayan bir elementtir. Kadmiyum, bitki ve hayvan bünyesinde birikebilme özelliğine sahiptir. Günlük gıdalarla alınan, ortalama kadmiyum miktarı 0,2-5 µg kadardır. Vücuda bir haftada alınan kadmiyum miktarının, 0,4-0,5 mg'ı aşmaması gerektiği bildirilmektedir (EFSA 2009). Yapılan deneysel çalışmalarda, alınan kadmiyumun bağırsaklardan emilim miktarı %4-7 oranlarında olduğu belirtilmiştir. Günlük vücuttan uzaklaştırılabilecek maksimum kadmiyum miktarı ise 40 µg kadardır. Dolayısıyla vücuda alınan fazla miktardaki kadmiyumun önemli bir kısmı bağırsaklardan emilmekte ve birikime uğramaktadır (Wang ve ark. 2009).

Kadmiyum, kurşun ve cıvayla birlikte en fazla toksik etkisi olan üç ağır metalden biridir. Kadmiyumun akut oral lethal dozu, 150-200 mg olduğu tahmin edilmektedir. Litresinde 13-15 mg kadmiyum bulunan suyun tüketilmesi sonucu, kusma ve mide krampları görülmüştür. Mesleki olarak akut kadmiyum zehirlenmeleri, metalin eritilmesi ve dökümü sırasında açığa çıkan dumanın, işçileri etkilemesinden kaynaklanmaktadır. Kadmiyum dumanının, m³'te 8 mg solunması sonucu ölümler gözlenmiştir. Kadmiyum dumanının, m³'te 0,5-2,5 mg düzeyinde solunmasında ise akut pnömoni gözlenmiştir (Järup ve ark. 1998, Wang ve ark. 2009).

Kadmiyum, böbrek kanseri oluşumunda potansiyel bir risk faktörüdür (Satarug ve Moore 2004). Kadmiyuma mesleki olarak ya da çevresel yollarla maruz kalındığında, böbreklerde hasar olduğu ve böbrek fonksiyonlarında yetersizlik gözleendiği bilinmektedir. Kadmiyumun böbrek tubullerinde oluşturduğu hasardan dolayı, glikozüri, proteinüri, hiperkalsiüri ve hiperfosfatüri gözleendiği ve böbrek konsantrasyon kapasitesinin azaldığı bildirilmektedir (Goering ve ark. 1995, Järup ve ark. 1998). Kadmiyuma mesleki olarak maruz kalan işçilerde, glomerular filtrasyon

hızının azaldığı birçok araştırma ile gösterilmiştir (Piscator 1984, Elinder ve ark. 1985, Roels ve ark. 1991). Kadmiyuma mesleki maruziyetin böbrek taşı oluşumunu artırdığı da belirtilmektedir (Elinder ve ark. 1985).

Kadmiyumun osteoporoz ve osteomalaziye sebep olduğu bilinmektedir. Yapılan deneysel çalışmalarda kadmiyumun kemikte biriktiği ve kemikteki kadmiyum konsantrasyonu arttığında kemik sertliğinin azaldığı bildirilmektedir (Ogoshi ve ark. 1989, Krishnan ve ark. 1990, Tsuritani 1996). Kadmiyum kirliliğinin sebep olduğu tarihi bir vaka 1950’li yıllarda Japonyada yaşanmıştır. Bu vaka, Birinci ve İkinci Dünya Savaşları sırasında artan madencilik faaliyetleri sonucu, Toyama bölgesinin toprak ve sularında kadmiyum kirliliği oluşması sonucu şekillenmiştir. Hastalık, o bölgede yetişen hububatla beslenen ve bölgenin suyundan istifade eden insanlarda, ostomalazi ve osteoporozla karakterize spontan kemik kırılmaları ile kendini göstermiştir. Hastalık, çok şiddetli kemik ağrıları ile seyrettiğinden, acı ve ağrı ifadesi olarak “Itai-Itai” sendrom olarak adlandırılmıştır (Goering ve ark. 1995). Ayrıca bu sendromun böbrek hasarı oluşumuyla birlikte seyrettiği rapor edilmiştir (Järup ve ark. 1998).

Kadmiyum maruziyetinin çeşitli dokularda kanser oluşumuna sebep olduğu bilinmektedir. Yapılan araştırmalarda mesleki olarak kadmiyuma maruz kalan işçilerde, akciğer kanseri oluşumunun artış gösterdiği ifade edilmiştir (Thun ve ark. 1985, Stayner ve ark. 1992). Kadmiyumun ayrıca prostat, testis ve göğüs kanserine neden olduğuna dair bulgular vardır (Waalkes ve Rehm 1992, Garcia Morales ve ark. 1994).

1.2.1.5. Kadmiyumun Dişi Üreme Sistemi Üzerine Etkisinin Araştırıldığı Çalışmalar

Kadmiyumun dişi üreme sistemine ait dokularda birikim gösterdiği bilinmektedir (Varga ve ark. 1993, Järup ve ark. 1998). Kadmiyumun etkisinin araştırıldığı çeşitli çalışmalarda, kadmiyumun östrüs siklusunu, oosit ve folikülerin gelişimini, korpus luteum oluşumunu, ovumun implantasyonunu ve üreme hormonlarının sentezini

etkilediği gösterilmiştir (Thompson ve Bannigan 2008, Iavicoli ve ark. 2009). Kadmiyumun ovaryumda yaşa bağlı olarak birikme oranının araştırıldığı bir çalışmada, 30-65 yaş aralığındaki kadınlarda, kadmiyumun birikme eğiliminde olduğu ifade edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca, sigara içen kadınlarda ovaryum kadmiyum içeriği, içmeyenlere kıyasla yüksek bulunmuştur (Varga ve ark. 1993). Maternal kadmiyum maruziyetinin doğum ağırlığına etkisinin araştırıldığı çalışmada, 57 japon anneden idrar ve süt numuneleri alınmış ve atomik absorpsiyon spektroskopisi ile bu numuneler incelenmiştir. Bu çalışmada maternal kaynaklı kadmiyumun anne sütüne geçtiği ve düşük doğum ağırlığına sebep olduğu gösterilmiştir (Nishijo ve ark. 2002).

Saksena ve Salmonsens (1983) tarafından golden hamsterları üzerinde gerçekleştirilen çalışmada, kadmiyum klorürün farklı dozlarının östrüs günleri boyunca hamsterlara subkutan olarak enjekte edilmesi sonucu, uygulanan dozlardan 5 mg/ kg ve 10 mg/kg'ın ovulasyonu engellediği ve serum progesteron miktarını düşürdüğü gösterilmiştir. Kadmiyumun ovulasyon üzerine etkisinin araştırıldığı bir diğer çalışmada ise, ratlara uygulanan 10 mg/kg kadmiyum klorürün hipofiz bezinin LH içeriğini düşürdüğü ve ovulasyonu engellediği belirtilmiştir (Varga ve Paksy 1991).

Yang ve ark. (2004) tarafından hamster ovaryumları üzerinde kadmiyumun hücre canlılığı üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada, kültüre edilen hücreler, kadmiyumun 0,1; 0,4; 1 ve 4 μ M dozlarına maruz bırakılmıştır. Anılan çalışmada hücre çoğalmasını düşük dozlar (0,1 ve 0,4 μ M) etkilemezken, 1 μ M'lık doz 12. saatten sonra hücre sayısının artışını önemli derecede etkileyerek, çoğalmayı engellediği, 4 μ M'lık dozun ise 12. saatten sonra hücre ölümü sonucu hücre sayısını azalttığı tespit edilmiştir. Leoni ve ark. (2002) tarafından koyunlar üzerinde gerçekleştirilen çalışmada, kadmiyumun 2 ve 20 μ M düzeyindeki dozlarının in vitro uygulanması sonucu, oosit canlılığının önemli derece etkilendiği gösterilmiştir. Kurbağalar üzerinden gerçekleştirilen benzer bir çalışmada ise, kadmiyum klorürün 0,5; 0,75; 1, 3 ve 5 mg/kg dozlarının 21 gün boyunca hayvanlara enjekte edilmesi

sonucu, doza bağımlı olarak kadmiyumun atretik folikülleri önemli derecede artırdığı ve oogenesisi engellediği belirtilmiştir (Lienesch ve ark. 2000).

Rehm ve Waalkes (1988) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, kadmiyum klorürün 20-47,5 µM/kg dozları subkutan olarak fare, rat ve hamsterlara enjekte edilmiş ve uygulanan dozla orantılı olarak, artan dozlarda ovaryumlarda hemoraji, nekroz ve küçük arterlerde hasarların meydana geldiği ve korpus luteumun sınırlı olduğu gözlenmiştir.

Fare embriyoları üzerinde yapılan in vitro bir çalışmada, kadmiyum klorürün 0,5 µg/ml uygulanması sonucu, embriyo implantasyonunda azalma tespit edilmiştir. Kadmiyumun daha yüksek dozlarda (5 ve 10 µg/ml) uygulanması sonucu ise implantasyon oranının düşmesinin yanısıra, embriyolarda nekroz oluşumu da gözlenmiştir (Yu ve ark. 1985). Gebe farelerde kadmiyum klorürün prenatal etkisinin araştırıldığı çalışmada, kadmiyum klorür 5-6 mg/kg düzeylerinde intra peritoneal olarak enjekte edildiğinde, embriyo germ hücrelerinin olgunlaşmasında kusurlar ve sayısında azalma gözlenmiştir (Tam ve Liu 1985).

Ratlar üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada (Nampoothiri ve Gupta 2005), hayvanlar in vivo olarak 0,025 mg/kg kadmiyum asetatı 15 gün boyunca maruz bırakılmıştır. Kadmiyuma maruz bırakılan hayvanların ovaryumlarındaki granuloza hücre sayısının önemli derecede azaldığı ve ovaryum dokusu üzerinde yapılan metal analizinde kadmiyumun birikim gösterdiği gözlenmiştir. Söz konusu çalışmada ayrıca granuloza hücreleri kültürü edilmiş ve FSH ve LH'nin hücreye bağlanmasında ve 17β-hidroksisteroid dehidrogenaz enziminin aktivitesinde önemli derecede azalma meydana geldiği gösterilmiştir.

Paksy ve ark. (1992) tarafından ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada, kadmiyum klorürün artan dozlarının (27, 54, 109 ve 218 µM), granuloza ve luteal hücreler üzerindeki steroidogenik etkisi araştırılmıştır. Anılan çalışmada kadmiyumun progesteron ve östrojen miktarını önemli derecede azalttığı gözlenmiştir. Paksy ve ark.(1997) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise,

kadmiyum klorüre maruz bırakılan insan granuloza hücrelerinin morfolojisinde ve fonksiyonlarında değişiklikler meydana geldiği ortaya konmuştur. Bu deneyde kadmiyumun hücreler arası iletişimi bozduğu ve bundan dolayı oositlere sinyal ve besin geçişinin kısıtlandığı gösterilmiştir. Söz konusu çalışmada ayrıca kadmiyumun farklı dozlarının progesteron sentezi üzerine etkisini araştırmak amacıyla, granuloza hücreleri 48 saat süreyle, kadmiyum klorürün çeşitli dozlarına (8, 16, 32 ve 64 µM) maruz bırakılmıştır. Artan kadmiyum konsantrasyonunun üretilen progesteron miktarını, kontrol grubuna kıyasla %20'den %60'a kadar düşürdüğü gösterilmiştir. Yine kadmiyumun ovaryum üzerindeki steroidogenik etkisinin araştırıldığı benzer bir çalışmada da, hem in vivo hem de in vitro olarak, kadmiyumun östrojen ve progesteron miktarını düşürdüğü tespit edilmiştir (Piasek ve Laskey 1994).

Pillai ve ark. (2003) tarafından yapılan çalışmada, kadmiyum asetatın 15 gün boyunca intraperitoneal olarak ratlara verilmesi (0,05 mg/kg) sonucu hem serumda hem de hipofizde FSH ve LH seviyelerinin önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir. Anılan çalışmada ayrıca, FSH ve LH seviyelerinde artışa sebep olduğu bilinen serotoninin, hipotalamustaki seviyesinde önemli derecede azalma meydana geldiği gösterilmiştir.

İnsan trofoblast hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, kadmiyum klorürün artan dozlarda (5, 10 ve 20 µM) hücre kültüründe uygulanması sonucu, progesteron üretiminin %60'a varan oranda azaldığı ortaya konmuştur (Jolibois ve ark. 1999). Aynı hücre üzerinde yapılan bir başka çalışmada, kadmiyum klorürün 20 nmol/ml dozda uygulanması sonucu, insan koryonik gonadotropin hormon (HCG)'un salınımının azaldığı ve kadmiyumun plasenta da biriktiği ifade edilmiştir (Eisenmann ve Miller 1994). Yine trofoblast hücreleri üzerinde yapılan bir başka çalışmada, kadmiyum klorür 0,16 µM ve üstü dozlarda uygulandığında, hücre morfolojisi ve fonksiyonunda bozukluklar gözlenmiştir. Bu dozlarda, kalsiyum alınımı ve bağlanması azalmıştır. Ayrıca metallothionein ekspresyonunun arttığı da ifade edilmiştir (Lin ve ark. 1997).

Tavşanlar üzerinde gerçekleştirilen in vivo çalışmada, kadmiyum klorür 1,5 mg/kg dozda uygulandığında, ovaryumda primer folikül sayısında azalma ve atretik folikül sayısında artış gözlenmiştir. Aynı çalışmada ovaryum, oviduct ve uterus dokusunda, hücre çekirdeği ve mitokondrinin yapısında anormalliklerin gözlemlendiği ve endoplazmik retikulum ve perinükleer sisternanın genişlediği belirtilmiştir. Bu dokularda ayrıca, kan damarı duvarlarındaki hasardan dolayı ödematöz yapı gözlemlendiği belirtilmiştir (Massanyi ve ark. 2007).

Zhang ve Jia (2007) tarafından ratlar üzerinde yapılan çalışmada, in vivo ve in vitro olarak kadmiyumun etkisi araştırılmıştır. Kadmiyumun çeşitli dozları (10, 20 ve 40 μM) in vitro uygulandığında, granuloza hücreleri tarafından sentezlenen progesteron miktarının en yüksek dozda (40 μM) %60 oranında azaldığı belirtilmiştir. Kadmiyum klorür 0;2, 5;5 ve 7,5 mg/kg dozlarda subkutan olarak enjekte edildikten 24 saat sonra, serum progesteron düzeyi uygulanan bütün dozlarda yaklaşık %50 oranında düşmüştür. Ayrıca hem in vivo hem de in vitro olarak StAR ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir. Domuz granuloza hücreleri üzerinde yapılan benzer bir çalışmada, 3 μM kadmiyum klorür uygulandığında, P450scc gen aktivitesinin azaldığı ifade edilmiştir (Smida ve ark. 2004).

1.2.2. KURŞUN

1.2.2.1. Kurşunun Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Kurşun (Pb) periyodik çizelgenin IV-A grubunda yer alan parlak mavimsi gri bir metaldir. Kurşunun atom numarası 82, atom ağırlığı 207,2 ve yoğunluğu 11,4 g/cm³'tür. Yumuşak tabiatı ve düşük erime sıcaklığı (327°C) sayesinde kolay şekil verilebilir ve dövülebilir. Elektrik iletkenliği az olup, korozyona karşı çok dirençlidir (Bradl 2005).

1.2.2.2. Kurşunun Kullanım Alanları

Kurşun yaygın bir şekilde kullanılan en eski metallere birisidir. Kurşun, Roma İmparatorluğunda su borularında, su saklama haznelerinde yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Kurşunun Roma'da bu derece çok kullanılması, epidemik kurşun zehirlenmelerine sebep olmuş ve Roma İmparatorluğunun çökmesinin sebeplerinden biri olarak gösterilmiştir (Gilfillan 1965). 1940'lı yıllarda kurşun bileşiklerinin benzine katılması sonucu çevreye yayılımı önemli derecede artmıştır (Komárek ve ark. 2008).

Dünya geneli yıllık kurşun tüketimi 3 milyon tonun üzerindedir. Bu miktarın önemli bir kısmı, akü ve batarya sanayinde kullanılmaktadır. İnşaat ve yapı sektöründe boru, levha ve tel şeklinde, yüksek miktarlarda kurşun kullanılmaktadır. Kaplama maddesi olarak kablo üretiminde, renk maddesi olarak boya sanayinde ve sağlamlık elde etmek için PVC üretiminde de yüksek miktarlarda kurşun kullanılmaktadır (Scoullou ve ark. 2001).

1.2.2.2. Kurşuna Maruziyet

Kurşun, yer kabuğunda düşük miktarlarda bulunmakta olup çeşitli doğal dönüşümler ile açığa çıkmaktadır (IARC 2006). Fakat kurşunun çevreye yayılmasında en büyük faktör, madencilik faaliyetleri ve çeşitli endüstrilerde kullanılması sonucu insan kaynaklı yayılımdır (UNEP 2008).

Kurşun, havada birikim gösterebilmekte ve solunum yollarından %50 oranlarında absorbe olabilmektedir (Järup 2003). Bundan dolayı madencilik faaliyetlerinde, gemi, inşaat, kaplama, kaynak, boya ve cam sektörlerinde çalışan işçiler solunum yoluyla önemli düzeyde kurşuna maruz kalabilmektedir. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde yetersiz işçi güvenliğinden dolayı bu maruziyet daha tehlikeli olabilmektedir (Tong ve ark. 2000, WHO 2010).

Kurşunun 20. yüzyılda benzine katılmasından dolayı çevresel yayılımı çok fazla artmıştır. Son 30-40 yıldır özellikle gelişmiş ülkelerde, motorlu taşıtların yakıtına kurşun eklenmesine son verilmesiyle, kurşunun çevresel yayılımı önemli ölçüde düşmüştür (Järup 2003). Fakat gelişmekte olan ülkelerde hala benzine kurşun eklendiği bilinmektedir (WHO 2010).

Kurşun, nörotoksik etkisinden dolayı çocuklarda geri dönüşümsüz nörolojik bozukluklara sebebiyet vermektedir. Çocukların bu derece hassas olmaları, kan-beyin bariyerinin tam olarak gelişmemesinden ve çocuklarda, kurşunun bağırsaktan emilim oranının çok daha yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. Kurşunun, çocuklar kadar olmasa da, yetişkinlerde de nörolojik bozukluklara sebebiyet verdiği bilinmektedir (Tong ve ark. 2000, Järup 2003). Gelişmekte olan ülkelerde benzine hala kurşun katıldığından dolayı, kontamine olmuş toprak, çocuklar için kurşuna maruziyetin ana kaynağını oluşturmaktadır. Evlerde duvarlardaki boyaların çocuklar tarafından sökülüp yenmesi ve kurşun içerikli oyuncaklar, kurşuna maruziyette önemli görülmektedir. Evlerin su tesisatları ve hazneleri, borular, levhalar veya lehimler eğer kurşun içeriyorsa, bu materyaller, su yoluyla bireylerin kurşuna maruziyetinde önem arz etmektedir (WHO 2010).

Sigara ve alkol kullananlar kurşuna daha fazla maruz kalmaktadırlar. Araştırmalarda, sigara içenlerin kan kurşun düzeyinin daha yüksek olduğu görülmüştür (IPCS 1995). Alkollü içecekler genelde asidik karakterde olduğundan, bu ürünler kurşun içerikli bir kaba konulduğunda, kurşunun serbest kalmasını artırmaktadır. Benzer şekilde asit oranı yüksek yiyecek ve içecekler de, konulduğu kap eğer kurşun ihtiva ediyorsa, kurşunun serbest kalmasını kolaylaştırarak söz konusu gıdaya daha fazla kurşun geçmesine neden olacaktır (WHO 2010).

Kurşunla kontamine olmuş tarım arazileri ve onlarda yetişen ürünler, canlıların kurşuna maruziyetinde önemlidir. Tahıllar yüksek miktarlarda kurşun içerebilmektedir. Nitekim araştırmalarda kontamine olan toprakta yetişen ürünlerde kurşun miktarı yüksek bulunmuştur (Albering ve ark. 1999).

1.2.2.4. Kurşunun Toksik Etkileri

Yetişkinlerde kurşunun bağırsaklardan emilim oranı %10 kadarken, çocuklarda bu oran %40-53'e kadar yükselmektedir. Kurşunun solunum yollarından absorbe olma oranı ise %50 kadardır. Vücutta biriken kurşunun %80-95'i, kemik yapıda bulunmaktadır. Kemikteki kurşunun yarılanma ömrü 17-27 yıl iken, bu süre kanda 35 gün, karaciğer, akciğer ve dalak gibi yumuşak dokularda ise 40 gün kadardır (Rabinowitz ve ark. 1976, Wu ve ark. 2010). Yapılan tarihi araştırmalarda, Roma İmparatorluğu zamanında Roma'da yaşayan insanların kemik yapılarında yüksek miktarda kurşun varlığının tespit edilmesi, o dönem insanların kurşun zehirlenmesine maruz kaldığını göstermektedir (Gilfillan 1965, Järup 2003).

Kurşun merkezi sinir sistemini ciddi şekilde etkilemektedir. Akut zehirlenmelerde, sersemlik, halüsinasyon, kas tremorları ve hafıza kaybı gözlenmektedir. Çocuklarda ensefalopati vakalarında, kurşunun kandaki miktarı 80-100 µg/dl olduğu belirtilmiştir (Baker ve ark. 1984). Çocuklarda kan kurşun düzeyinin 5-10 µg/dl olduğu durumlarda; sinirsel davranış bozuklukları, hafıza zayıflığı, anlama güçlüğü ve dikkat kaybı gözlendiği belirtilmiştir (Téllez ve ark. 2006, Surkan ve ark. 2007). Gebe kadınların kurşuna maruz kaldığı durumlarda, erken doğum, düşükler, düşük doğum ağırlığı ve bebeklerde malformasyon şekillenebileceği rapor edilmiştir (IPCS 1995).

Kronik kurşun zehirlenmelerinde, huzursuzluk, uykusuzluk, baş ağrıları ve eklem ağrıları gözlenmiştir. Mesleki olarak kurşuna maruz kalan işçilerde kan kurşun konsantrasyonunun 40-60 µg/dl olduğu belirlenmiş ve bu işçiler üzerinde yapılan testlerde, kan kurşun düzeyi 60 µg/dl'ye yakın olanlarda daha fazla olmak üzere, hafıza zayıflığı, ifade güçlüğü ve ruhi bozukluklar gözlenmiştir (Baker ve ark. 1984). Ayrıca kurşuna maruziyetin anemiye, böbrek hastalıklarına ve şiddetli karın ağrısına sebep olduğu, dişi ve erkek üreme sistemini olumsuz yönde etkilediği ifade edilmektedir (Demayo ve ark. 1982, WHO 2010).

1.2.2.5. Kurşunun Dişi Üreme Sistemi Üzerine Etkisinin Araştırıldığı Çalışmalar

Kurşuna maruziyet her iki cinsten de pubertayı geciktirdiği ve düşük doğum ağırlığına sebep olduğu bilinmektedir (Ronis ve ark. 1998). Amerika'da tahmini olarak 3 milyon çocuğun ve 4,4 milyon genç kadının kurşuna toksik düzeyde maruz kaldığı düşünülmektedir (Crocetti ve ark. 1990, Huseman ve ark. 1992). Amerika'da gerçekleştirilen bir çalışmada, kan kurşun düzeyleri 3 µg/dl olan kızların ergenlik çağlarının geciktiği gösterilmiştir (Selevan ve ark. 2003). Yine kan kurşun düzeyi 10 µg/dl olan anne adaylarında gebelik hipertansiyonu geliştiği, spontan abortların meydana geldiği ve dünyaya gelen bebeklerde sinirsel gelişim bozukluğu gözlemlendiği belirtilmiştir (Bellinger 2005).

Pine ve ark. (2006) tarafından ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada, pubertanın gecikmesinde IGF-1 (İnsülin benzeri büyüme faktörü 1)'in rol oynayabileceği gösterilmiştir. Bu hormon, büyüme hormonu tarafından uyarılan ve karaciğerde sentezlenen bir hormon olup, dokular üzerinde anabolik etkiye sahiptir. Kurşunun karaciğer üzerine toksik etkisi sonucu, enzim sistemi bozulmakta ve IGF-1'in karaciğerde sentezlenmesi azalmaktadır. Bu hormon hipotalamusu uyarıp GnRH salınımını ve vücut gelişimini artırmasıyla ilgili olarak, ergenlik çağı üzerinde önemli görülmüştür. Söz konusu çalışmada, ratlar gebelik ve laktasyon döneminde kurşuna maruz bırakılmış ve sonuç olarak, bu hayvanlardan elde edilen yavruların LH salınımı, kontrol grubuna göre düşük çıkmış ve pubertaları gecikmiştir. Fakat IGF-1 uygulandığında hem kontrol grubunda hem de kurşuna maruz bırakılan grupta LH salınımının arttığı ve puberta yaşının iyileştiği gösterilmiştir. Kurşuna maruziyetin pubertayı geciktirdiğine dair yapılan benzer bir çalışmada (Ronis ve ark. 1996), ratlara kurşun asetat solüsyonunun ad-libitum olarak verilmesi sonucu pubertanın geciktiği gösterilmiştir. Anılan çalışmada yazarlar, kurşunun hipotalamus, hipofiz ve gonadlar arasındaki ilişkiye çok yönlü etki etmesinden dolayı puberta yaşının etkilendiğini tahmin etmişlerdir. Bu konuyla alakalı yapılan diğer çalışmalarda da gebelik ve laktasyon süresince kurşuna maruziyetin yavrularda pubertayı geciktirdiği ifade edilmiştir (Dearth ve ark. 2002, Iavicoli ve ark. 2006).

Kurşunun embriyo implantasyonu üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada (Wide 1980), farelere 75 ppm kurşun klorür intravenöz enjekte edilmiş ve kan kurşun düzeyinin 32 µM/L olduğu belirtilmiştir. Doz uygulanan grubun implantasyon oranı, kontrol grubuna kıyasla önemli derecede azalmıştır. Doz uygulaması yapılmış grubun 6 günlük embriyoları mikroskop altında incelendiğinde, embriyolarda morfolojik değişiklikler gözlemlendiği belirtilmiştir.

Kurşunun foliküler gelişim üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada (Junaid ve ark. 1997), farelere 2, 4 ve 8 mg/kg kurşun asetat solüsyonu 60 gün boyunca sonda ile içirilmiş ve uygulama sonrasında büyük foliküllerin sadece 8 mg/kg'lık dozdan etkilendiği gözlenirken, küçük ve orta büyüklükteki foliküllerin her iki dozdan da önemli derecede etkilendiği belirtilmiştir. Kurşunun foliküler gelişim üzerine etkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada (Taupeau ve ark. 2001), kurşun nitratın farelere 10 mg/kg dozda intraperitoneal olarak verilmesi sonucu, kurşunun follikülogenezisi bozduğu, atretik foliküllerin sayısını artırırken primordial folikül sayısını azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca söz konusu çalışmada, kurşunun ovaryum, fetüs, adrenal bez, karaciğer ve kemikte biriktiği gözlenmiştir.

Pillai ve ark. (2002) tarafından ratlar üzerinde gerçekleştirilen çalışmada kurşun asetatın intraperitoneal olarak verilmesi sonucu, kurşunun hipofiz bezinde biriktiği gözlenmiştir. Aynı çalışmada, hipofiz bezinin membran akışkanlığının ve enzim aktivitesinin azaldığı da gösterilmiştir.

Srivastava ve ark. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada, 12 mg/ml kurşun asetat uygulanan ratlardan doğan yavrularda, StAR ekspresyonunun ve östrojen sentezinin azaldığı gözlenmiştir. Çalışmada gebe kısırak serum gonadotropini (PMSG) uygulandığında, hem StAR hem de östrojen seviyesinde düzelme meydana gelmiştir. Çalışmada uygulanan PMSG'nin FSH benzeri etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Araştırmacılar bu sonuçları, kurşunun hipotalamus ve hipofizde hormon sentez ve salınımını olumsuz etkileyebileceği şeklinde yorumlamışlardır.

Paksy ve ark. (2001) tarafından yapılan bir çalışmada, in vitro fertilizasyon ve embriyo transferi gerçekleştirilen 23 kadından aspirasyon yöntemiyle foliküler sıvısı ve granuloza hücreleri elde edilmiştir. Elde edilen folikül sıvısı, atomik absorpsiyon spektrofotometresi ile analiz edildiğinde ortalama 11 µg/l kurşun varlığı tespit edilmiştir. Söz konusu çalışmanın hücre kültürü aşamasında, granuloza hücreleri 100-1600 µM kurşun asetatı maruz bırakıldığında, hücrelere 800 µM metal uygulamasından sonra, hücrelerin tabandan yavaş yavaş ayrıldığı ve yuvarlağımsı görüntü oluşturduğu, 1600 µM doz uygulamasından sonra ise hücrelerin yapışmadığı gözlemlenmiştir. Anılan çalışmada ayrıca sentezlenen progesteron miktarına da bakılmış ve 1600 µM'lık doz uygulamasından sonra, granuloza hücreleri tarafından sentezlenen progesteron miktarının önemli derecede azaldığı gösterilmiştir.

Kurşunun ovaryumda reseptör aktivitesi üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada, 20–200 ppm doz uygulanan ratlarda FSH ve LH hormonunun bağlanma oranının azaldığı ve progesteron sentezinin düştüğü gösterilmiştir (Wiebe ve ark. 1988). Aynı araştırmacı tarafından yapılan benzer bir çalışmada, kurşunun uterusu östrojen reseptörünün bağlanma oranını düşürdüğü de gösterilmiştir (Wiebe ve Barr 1988).

1.2.3. Cıva

1.2.3.1. Cıvanın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Cıva (Hg), periyodik çizelgenin II B grubunda yer alan gümüşü beyaz renkli bir metaldir. Cıva yer kabuğunda ortalama olarak 0,08 mg/kg oranında bulunur. Cıvanın çevrede bulunan en yaygın formu, kırmızı renkli cıva (II) sülfür (HgS) dür (Wang ve ark. 2009). Cıva, İngilizce ve Fransızcadaki adı olan “mercury”yi, tarihte Roma tanrısı diye adlandırılan Merkür'den almıştır. Sembölü olan “Hg”yi ise latince sıvı gümüş anlamına gelen “Hydragyrum” kelimesinden almıştır (Scoullos ve ark. 2001). Cıvanın atom numarası 80, atom ağırlığı 200,6, erime ısısı -38,8 °C ve yoğunluğu 13.55 g/cm³tür (Bradl 2005). Cıvanın buharlaşma ısısı 359,9 °C'dir, fakat düşük

sıcaklıklarda bile buharlaşma eğiliminde olduğu için uçucu metal olarak bilinmektedir (Scoullos ve ark. 2001).

1.2.3.2. Cıvanın Kullanım Alanları

Cıva antik çağlardan beri kullanılan bir metaldir. Cıvanın Çin, Hind, Yunan ve Mısır tarihinde kullanıldığı bilinmektedir. Cıvanın indirgenme ürünü olan zincifre, kırmızı renginden dolayı boya maddesi olarak kullanılmıştır. Yunan tarihinde cıvanın kozmetik amaçlı deriyi parlatmak için kullanıldığı bilinmektedir (Järup 2003, Scoullos ve ark. 2001).

Cıvanın insan kaynaklı yıllık çevreye yayılımı 10 000 ton kadardır. Cıva ve onun bileşikleri, termometrelerde, florasan ve ultraviole lambalarda, çimento üretiminde, diş dolgu maddesi yapımında, ilaç ve fungusid üretiminde, boya imalatında, kâğıt, pil ve elektrik sanayinde kullanılmaktadır (Wang ve ark. 2009). Fosil yakıtların yanması sırasında, madencilik faaliyetleri sürecinde ve katı atıkların yakılması sırasında önemli miktarlarda cıva açığa çıkmaktadır (Scoullos ve ark. 2001).

1.2.3.3. Cıvaya Maruziyet

Cıva doğada, metalik cıva, inorganik cıva (örneğin cıva klorür) ve organik cıva (örneğin metil cıva) olmak üzere üç formda bulunur. Metalik cıvanın bağırsaklardan emilim düzeyi çok düşüktür. İnorganik cıva tuzlarının bağırsaklardan emilim oranı %7-15 oranlarına iken, organik cıvanın emilim oranı %95 civarındadır. Akciğerlerden hava yoluyla emilim ise, en fazla metalik cıvanın solunmasında gerçekleşmektedir (Wu ve ark. 2010).

Cıvanın sıvı metalik formu, yüksek derecede buharlaşabildiğinden ve solunum yollarından çok fazla emildiğinden dolayı, cıva maruziyetinde önemli görülmektedir. Diş dolgusu materyali olarak kullanılan amalgam %50 metalik cıva ihtiva ettiği için,

diş teknisyenleri tarafından hazırlanma sürecinde kısmen buharlaşmaktadır. Bu yüzden mesleki anlamda cıva maruziyetinde, diş teknisyen ve hekimleri en fazla cıvaya maruz kalan grup içerisinde (Järup 2003). Metalik cıva kostik soda üretiminde, termometre, termostat, floresan, batarya ve manometre gibi ürünlerin yapımında kullanılmaktadır. Bu ürünlerin üretimi sırasında cıva kısmen buharlaşmakta ve işçileri etkilemektedir. Termometre, batarya ve floresan evlerimizde de yaygın şekilde kullanıldığından, bu ürünlerin kırılması ya da deforme olması durumunda cıva buharına maruz kalınabilmektedir (Clarkson ve Magos 2006).

Metil cıva, organik cıva bileşiklerinden biridir. İnorganik cıva mikroorganizmalar tarafından metil cıvaya dönüştürülmektedir. Metil cıva sudaki planktonlar tarafından tutulmakta ve bunlarla beslenen balıkların ve kabuklu deniz canlılarının dokularına transfer olarak önemli boyutlarda birikebilmektedir. Bu birikim yeteneğinden dolayı kontamine balık ve kabuklular, metil cıvaya gıda yoluyla maruziyetin ana kaynağını oluşturmaktadır (Bayen ve ark. 2005, IPCS 1990).

1.2.3.4. Cıvanın Toksik Etkileri

Son birkaç yüzyıldır cıvanın zehirleyici etkisi bilinmesine rağmen, son derece tehlikeli olduğu ancak 1953 yılında 600 kişinin ölümüyle sonuçlanan Minamata vakası ile anlaşılmıştır (Davidson ve ark. 2004, Wang ve ark. 2009). Bu olayda, zehirlenmenin kaynağı olarak Minamata körfezi civarındaki plastik fabrikası gösterilmiştir. Plastik üreten fabrikanın 20 yıl süren faaliyeti sonucu çevre sulara büyük miktarda yüksek derecede nörotoksik olan metilciva yayılmıştır. Bu sulara yetişen balık ve kabukluları yiyen insanlarda nörolojik bozukluklar şekillenmiştir. Metilciva zehirlenmesinde; psikolojik sorunlar, uyuşukluk, sallantılı yürüyüş, bulanık görme, işitme, koku ve tat almada sorunlar ve yeni doğan çocuklarda süngerimsi beyin olgusu gözlemlenmiştir (Ekino ve ark. 2007, Wu ve ark. 2010). Cıva zehirlenmesinde diğer tarihi bir vaka ise, Irakta 1970 yılında yaşanmıştır. Cıva ile kontamine olmuş tahıldan yapılan ekmekten yiyen 10 000'i aşkın kişi zehirlenmiş ve bu zehirlenme sonucu birkaç bin kişi hayatını kaybetmiştir (Järup 2003).

Cıva klorür yakın tarihte sağlık alanında yaygın şekilde kullanılmaktaydı. Müshil ilacı olarak ve dış çıkarıcı çocuklarda dış tozu şeklinde kullanılması sonucu zehirlenme vakalarına sebep olmuştur. Dış tozu kullanan çocuklarda, aşırı terleme, ellerde ve ayaklarda kırmızımsı ağrılı şişlikler, vücudun çeşitli bölgelerinde döküntüler, ilgisizlik, halsizlik, kilo kaybı, dikkat kaybı ve fotofobi gibi semptomların şekillendiği rapor edilmiştir (Clarkson ve Magos 2006). Cıva klorür müshil ilacı olarak kullanıldığında nörolojik semptomlar ve böbrek yetmezliği olduğu rapor edilmiştir (Davis ve ark 1974).

Merkürük cıva suda çözünebilen çok toksik bir cıva formudur. Merkürük cıvanın bir gramı bile öldürücü olabilmektedir. Cıvanın bu formu böbrekte birikmekte ve böbrek yetmezliğine sebep olmaktadır. Merkürük cıva oral yolla alındığında gastroenteritise ve stomatitise sebep olduğu rapor edilmiştir. Merkürük okside solunum yoluyla maruz kalan işçilerde, oluşturduğu hasar sonucu solunum yetmezliği şekillendiği bildirilmiştir (Clarkson ve Magos 2006).

Metalik ve metil cıva'nın merkezi ve periferik sinir sisteminde yüksek derecede toksik etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Özellikler çocuklar ve gebeler, cıva alımına çok hassastırlar. Kontamine balık yoluyla alınan cıva plasentaya geçmekte ve fetüsün sinirsel gelişimini etkileyerek konuşma güçlüğüne, hafıza, işitme ve görme kaybına sebep olabilmektedir (IPCS 1990).

1.2.3.5. Cıvanın Dışı Üreme Sistemi Üzerine Etkisinin Araştırıldığı Çalışmalar

Cıvanın üreme sistemine olumsuz yönde etki ederek, abort, ölü doğum, konjenital malformasyon, kısırlık, ovulasyonun engellenmesi ve menstrüel siklusun bozulması gibi problemlere sebebiyet verdiği bildirilmektedir (Schuurs 1999). Cıva buharına maruz bırakılan ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada, ratların vücut ağırlığında azalma meydana geldiği, östrüs süresinin uzadığı ve korpus luteumun morfolojisinde bir kısım değişiklikler olduğu gözlenmiştir (Davis ve ark. 2001). Araştırmalarda cıvanın hipotalamus, hipofiz ve ovaryumda biriktiği gösterilmiştir (Kosta ve ark. 1975, Ernst ve ark. 1993). Ayrıca Lamperti ve Printz (1974) korpus luteum

dokusunda, ovaryumun genel kısmına oranla daha fazla cıva biriktiğini göstermişlerdir. Cıva yüksek derecede reaktif olduğu için bu dokularda hücre içi enzim ve protein sistemlerini bozmakta ve bundan dolayı feedback mekanizmasını etkileyip, üreme problemlerine sebep olabileceği düşünülmektedir (Davis ve ark. 2001).

Lamperti ve Printz (1973) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise hamsterlara günlük 1 mg cıva klorür verilmesi sonucu korpus luteumun geç oluştuğu, foliküler gelişimin zayıf kaldığı, serum progesteron seviyesinin düştüğü ve östrüs süresinin uzadığı tespit edilmiştir. Lamperti ve Niewenhuis (1976) tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise, cıva klorür östrüs siklusu boyunca dişi hamsterlara günde 1 mg enjekte edilmiş ve sonrasında yapılan analizlerde hem serumda hem de hipofizde FSH ve LH seviyelerinin arttığı gözlenmiştir.

Diş hekimliğinde kullanılan amalgam %50 oranında cıva içermektedir. Bundan dolayı, amalgam hazırlayan diş teknisyenleri cıva buharına önemli ölçülerde maruz kalmaktadırlar. Nitekim kadın diş teknisyenlerinin üreme kapasiteleri araştırıldığında, infertilitenin arttığı tespit edilmiştir (Rowland ve ark. 1994, Schuurs 1999).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Araç ve Gereçler

2.1.1 Kullanılan Cihazlar

1. Laminar flow kabini (Esco Class II)
2. İverted mikroskop (Olympus)
3. Masa tipi buharlı otoklav cihazı (Systec)

4. Poşetleme cihazı (Euroseal)
5. Hava dezenfeksiyon cihazı (Light Prossess)
6. Ultra saf su cihazı (Millipore)
7. Etüv (Nüve)
8. Hassas terazi (Sartorius)
9. Vorteks (Stuart)
10. Santrifüj cihazı (Hettich)
11. Mini santrifüj (Eppendorf)
12. Karbondioksitli inkübatör (Binder)
13. Su banyosu (Julabo)
14. Gamma sayacı (Mini-assay type 6.20)

2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Dulbacco's Modified eagles medyum/Nutrient mixture F-12 HAM (Sigma D8437, USA)
2. 22(R)-Hydroxycholesterol (Sigma H9384, USA)
3. 5 β -Androstan-3 β -ol-17-one (Steroloids A3670, Newport)
4. ITS Liquid Media Supplement (Sigma I3146, USA)
5. Antibiotic/Antimycotic Gamma-İrradiated Cell Culture Tested (Sigma A5955, USA)
6. Bovine Serum Albumin (Sigma A9418, USA)
7. Newborn Calf Serum (Sigma N4637)

8. Beta-Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrate (Sigma N7004, USA)
9. Nitro Blue Tetrazolium Grade Iıı Crystalline (Sigma N5514,USA)
10. Trypan Blue Solution Cell Culture Tested (Sigma T8154, USA)
11. Phosphate Buffer Solution Tablets (Sigma 79382, USA)
12. Sigmacote (Sigma SL2, USA)
13. Deoxyribonuclease (Sigma D4527, USA)
14. Cadmium Chloride (Sigma 202908, USA)
15. Lead(II) Acetate Trihydrate (Sigma 316512, USA)
16. Mercury(II)Chloride (Sigma 203777, USA)

2.1.3. Kullanılan Diğer Sarf Malzemeler

1. Millex-GP Sırına Ucu Filtre, 0.22 μm , PES membran (Milipore SLGP033RS, Germany)
2. Hücre kültürü pleyti, 6 kuyucuklu (Corning CC3516, USA)
3. Tek kullanımlık 10 ml'lik steril pipet (Corning CC4488, USA)
4. Santrifüj tüp, 15 ml (Corning CLS430053, USA)
5. Santrifüj tüp, 50 ml (Corning CLS430897, USA)
6. Hücre süzgeci, 100 μm (BD Falcon 352360, USA)

2.2. Yöntem

Tez çalışması kapsamında üç farklı ağır metalin, luteal progesteron sentezi üzerine etkisi araştırıldı. Çalışmada luteal hücreler izole edildikten sonra, farklı dozlarda ağır metal ilave edilen kültür ortamında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kullanılmış medyum toplandı ve Radioimmunoassay (RIA) yöntemiyle progesteron analizi yapıncaya kadar -20 °C'de dondurularak saklandı. Daha sonra hormon analizi yapılarak progesteron sentezinde meydana gelen değişiklikler kaydedildi ve değerlendirildi.

Mevcut çalışmanın hücre kültürü aşaması, Arıkan ve Rodway (2000)'ın çalışmalarında kullandığı metodun modifiye edilmesiyle yedi ana kısımda gerçekleştirildi. Bu kısımlar; deney öncesi yapılan hazırlıklar, uygun dokunun toplanması, luteal hücrelerin izolasyonu, hücre sayımı, inkübasyon sırasında hücrelere uygulanacak metal dozlarının hazırlanması, hücrelerin inkübasyonu ve hormon analizinden ibarettir.

2.2.1. Deney Öncesi Yapılan Hazırlıklar

Hücre kültürü süresince kirlenmiş olan metal ya da cam malzemeler, akan su altında kirlerinden arındırıldıktan sonra sabunlu suda 1 gün bekletildi. Sabunlu suda bekleyen malzemeler suyun altında iyice durulandıktan sonra, distile sudan geçirilerek (10 kez) kurutulmak üzere 4-5 saat süreyle etüve (75 °C) kaldırıldı.

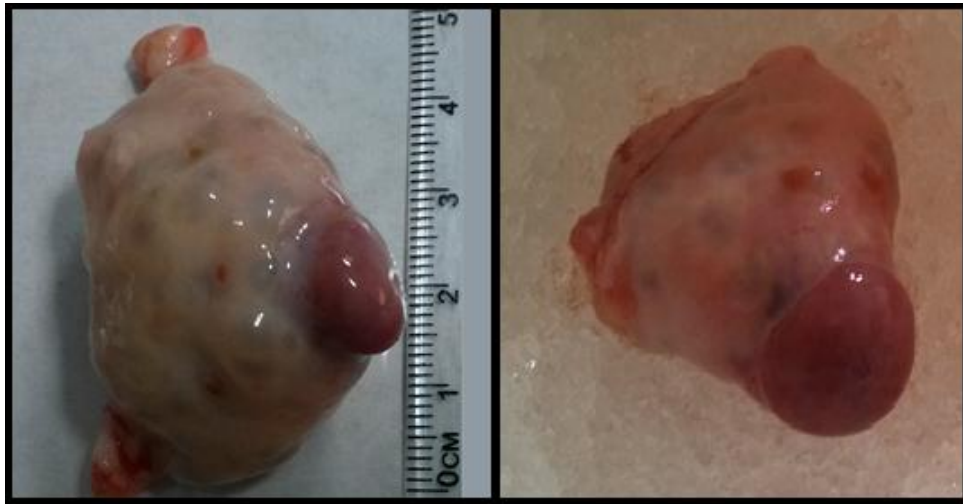
Hücre izolasyonu sırasında pastör pipeti, erlenmayer ve huni gibi bazı cam malzemeler hücrelere temas etmektedir. Bu malzemelerin üretimi sırasında yüzeylerinde şekillenen mikroskobik çıkıntılar, hücre membranına zarar vermekte ve hücrenin ölümüne sebep olabilmektedir. Hücrelerde meydana gelebilecek olası hasarın engellenmesi amacıyla, hücrelere temas eden bütün cam malzemelerin iç yüzeyi pürüzsüz hale getirildi. Bu amaçla Sigmacote (Sigma SL2, USA) solüsyonu kullanıldı. Cam malzemelerin iç yüzeyi bu kimyasalla temas ettiği zaman, yüzey ince bir filmle kaplanmakta ve pürüzsüz hale gelmektedir. Malzemeler sigmacote'tan

geçirildikten sonra kurutulmak üzere etüve (75 °C) kaldırıldı. Kurutma işleminden sonra sigmacote'a maruz kalmış bütün cam malzemeler distile sudan 8-10 kez geçirildikten sonra tekrar etüve kaldırılarak kurutuldu.

Hücre kültüründe kullanılacak bütün malzemeler sterilizasyon amacıyla bireysel olarak otoklav poşetiyle paketlenildi ve ardından otoklavda 121 °C'de, 20 dakika süreyle sterilize edildi. Deneye başlamadan önce ortam dezenfeksiyonun sağlanması amacıyla, kapalı devre sistemi özelliğindeki hava dezenfeksiyon cihazı (Light Prossess) çalıştırıldı. Ayrıca deneyden önce, laminar kabine alınan malzemelerin ve kabin içinin dezenfeksiyonu amacıyla, 15 dakika süreyle ultraviyole (UV) lambası çalıştırılarak ortam ve malzemelerin yüzey dezenfeksiyonu sağlandı.

2.2.2. Doku Seçimi

Mevcut çalışmada korpus luteum kaynağı olarak inek ovaryumları kullanıldı. Deneylede kullanılan dokular mezbahadan temin edildi. Kesimden hemen sonra toplanan ovaryumlar steril şartlarda buz içerisinde laboratuvara ulaştırıldı. Getirilen ovaryumlar Ireland ve ark. (1980)'nin belirttiği kriterler ışığında değerlendirilerek (Çizelge 2.1) midluteal dönem korpus luteumu bulunduran en uygun ovaryum belirlendi (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Ovaryum ve korpus luteumun görünümü.

Çizelge 2.1. İnek korpus luteumunda östrüs siklusu boyunca meydana gelen morfolojik değişiklikler (Ireland ve ark. 1980).

Korpus Luteumun Görünümü	Östrüs Siklusunun Aşamaları			
	1. (1-4)	2. (5-10) Midluteal	3. (11-17) Midluteal	4. (18-20)
Dokunun dış kısmı	Kırmızı, ovulasyon yeni gerçekleşmiş, ovulasyon noktası epitel doku tarafından henüz örtülmemiş	Ovulasyon noktası örtülmüş, korpus luteumun tepe kısmı kırmızı ya da kahverengi	Turuncu ya da hafif kahverengi	Açık sarı veya beyaz
Dokunun iç kısmı	Kırmızı, nadiren kanla dolmuş, doku gevşek tabiatta	Yalnızca baş kısmı kırmızı ya da kahverengi, dokunun kalan kısmı turuncu	Turuncu	Turuncu ya da sarı
Dokunun çapı	0,5 – 1,5 cm	1,6 - 2 cm	1,6 - 2 cm	1 cm'den küçük
Dokunun yüzeyindeki damarlaşma durumu	Gözükmemekte	Genellikle periferde sınırlı	Dönemin başlangıcında periferde, ilerleyen süreçte dokunun baş kısmına doğru seyretmekte	Gözükmemekte
10 mm'den büyük folikül varlığı	Gözükmemekte	Görülmemekte	Net değil, bazen görülebilir	Görülmemekte

2.2.3. Luteal Hücrelerin İzolasyonu

2.2.3.1. İzolasyon İçin Dokunun Hazırlanması

Laboratuvara getirilen ovaryumların çalışma için en uygun olanı belirlendikten sonra, seçilen ovaryum %70'lik alkolden geçirilerek yüzey dezenfeksiyonu sağlandı. Sonra, alkolün uzaklaştırılması amacıyla ovaryum steril fizyolojik tuzlu suyla yıkandı ve laminar kabin içindeki steril plastik petri kutusuna alındı. Kabin içerisinde korpus luteum dokusu makas yardımıyla ovaryumdan ayrıştırıldı. Ardından luteal doku bir başka steril plastik petri kutusuna aktarıldı ve tek taraflı steril jilet

yardımıyla küçük parçalara ayrıldı. Parçalanmış doku, kan hücrelerinin uzaklaştırılması amacıyla, huni üzerine yerleştirilen steril bir süzgeç (100 µm çapında por aralığına sahip) içerisine aktarıldı ve medyumla yıkandı. Yıkamış doku, cam huni yardımıyla ağzı kapaklı erlenmayere aktarılarak medyum hazırlanacağı kadar + 4 °C'ye kaldırıldı.

2.2.3.2. Medyum Hazırlanması ve Hücre İzolasyonu

İzolasyon medyumunun bileşiminde, bağ dokunun sindirilmesini sağlayacak ve ortaya çıkan serbest hücreleri besleyecek kimyasallar bulunmaktadır. Medyuma ilave edilen kollejenaz, bağ dokuyu sindirmekte ve hücrelerin bireysel olarak serbest kalmasını sağlamaktadır. Kollejenazın aktivitesi sırasında parçalanmış hücrelerden DNA açığa çıkmaktadır. Serbest kalan DNA, hücrelerin birbirine yapışmasına sebep olmaktadır. Bu yüzden DNA'nın ortamdaki uzaklaştırılması gerekmektedir. Medyum karışımına ilave edilen DNA'az sayesinde DNA parçaları uzaklaştırılmakta ve bu problemin önüne geçilmektedir. Hücrelerin izolasyon boyunca yeterince beslenebilmesi için medyuma bovine serum albumin (BSA) katılmaktadır. Ayrıca kullanılan medyum da, ihtiva ettiği bileşenler sayesinde hücrelerin beslenmesinde ve optimum koşulların sağlanmasında görev almaktadır. İzolasyon sırasında olası bir bakteriyel üreme riskine karşı medyuma antibiyotik-antimikotik karışımı da katılmaktadır.

Luteal dokuya yapılan enzimsel muameleler sonrasında bir seferde bütün dokunun hücrelerine ayrışması mümkün değildir. Bu nedenle yeterli miktarda hücre elde etmek için işlem toplamda yedi defa tekrarlandı. İzolasyon için hazırlanan medyum karışımı 70-72 ml olacak şekilde hesap edildi. Kullanılan kimyasalların oranları; BSA ml'de 2,5 mg, DNA'az ml'de 0,04 mg, kollejenaz ml'de 0,2 mg ve son olarak antibiyotik-antimikotik solüsyonu %1 oranında hesap edildi. Medyum karışımı hazırlanırken öncelikle 70 ml medyum (15 mM HEPES içeren Dulbecco's Modified Eagle's and HAM's F-12 nin bire bir karışımı) steril bir pipetle 100 ml'lik steril bir cam şişeye alındı. Sonra medyuma, yukarıda bahsedilen oranlarda BSA, DNA'az ve antibiyotik ilave edildi ve iyice çalkalanarak karışması sağlandı.

Kollejenaz sıvı içinde zamanla aktivitesini kaybettiğinden dolayı toplu olarak medyuma katılmayıp her işlem öncesinde tartılarak, medyuma sonradan ilave edildi. İzolasyonda bundan sonraki işlemler aynı şekilde gerçekleşmek üzere toplamda yedi defa tekrarlandı. Medyum karışımından (BSA, DNA'az ve antibiyotik içeren) 10 ml alınarak steril bir erlenmayere aktarıldı ve üzerine 2 mg kollejenaz ilave edildi. Sonrasında kollejenaz ilave edilen medyum, oksijen tüpü kullanılarak 2 dakika süre ile oksijenlendi. Oksijenlenmiş medyum karışımı 10 ml'lik steril enjektöre çekildi ve enjektörün ucuna takılan şırınga ucu filtreden (0,22 µm) geçirilerek sterilizasyonu sağlandı. Filtre edilen medyum, içinde doku bulunan erlenmayere aktarıldı. Sonrasında erlenmayer ağzı kapatılarak 37 °C'deki çalkalamalı su banyosuna 30 dakika süreyle kaldırıldı. Süre tamamlandığında serbest kalan ve dokunun üstünde yüzen hücreler, çökmüş olan sindirilmemiş dokuyu hareketlendirmeden, pastör pipeti yardımıyla dikkatli bir şekilde alınarak tüpe (15 ml'lik falkon) aktarıldı. Bu işlem bundan sonra toplamda altı defa daha tekrarlandı. Otuz dakikalık birinci inkübasyondan sonra gerçekleştirilen diğer inkübasyonlar 15 dakika arayla tekrarlandı.

Luteal doku tamamen parçalandığında, elde edilen bütün süpernatantlar, parçalanmamış dokulardan arındırılması amacıyla 100 µm çapında porlara sahip steril filtreden geçirilerek büyük bir tüpe (50 ml'lik falkon) toplandı. Elde edilen hücreleri kollejenaz ve DNA'az kalıntılarında arındırmak amacıyla, tüpün boş kısmına medyum konularak 300 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı ve dibe çöken hücreler dikkatli bir şekilde pipetlenerek tekrar medyumla yıkandı. Yıkama işlemi toplamda üç kez tekrarlandı ve çöken hücreler geniş bir erlenmayere alınarak sayılmak ve ekilmek üzere süspansiyon haline getirildi.

2.2.4. Hücrelerin Sayımı

Hücrelerin canlılık oranının belirlenmesinde trypan blue solüsyonu kullanıldı. Ölü hücrelerde trypan blue hücre membranını geçerek hücre içerisine girmekte ve hücreyi mavi renge boyamaktadır. Canlı hücrelerde ise trypan blue hücre

membranını geçemediği için hücreler saydam-beyaz renkte gözükmektedir. Trypan blue'nun bu özelliği kullanılarak, belli bir hacimde var olan hücrelerin yüzde kaçının ölüp ölmediği tespit edildi. Trypan blue ile canlılık oranının belirlenmesi şu şekilde gerçekleştirildi; hazırlanan süspansiyondan 100 µl alındı ve üzerine 100 µl trypan blue solüsyonu eklendi. Yaklaşık 4-5 dakika sonra, elde edilen karışımdan 10 µl alınarak hemositometrenin (Neubauer lamı) ilgili bölgesine bırakıldı ve karışımın lam ile lamel arasında yayılması sağlandı. Mikroskop altındaki incelemede maviye boyanan hücreler ölü, boya almayan hücreler ise canlı kabul edildi. Canlılık oranının %80 ve üstü olduğu durumlarda çalışmaya devam edilirken, canlılık oranının yetersiz görüldüğü durumlarda çalışmaya son verildi.

Luteal doku, luteal hücrelere ilaveten lökosit, eritrosit, mast hücresi ve fibroblast gibi çeşitli hücreleri de bulundurmaktadır. Bundan dolayı mevcut çalışmada, hücre sayımı sırasında steroidojenik aktiviteye sahip luteal hücrelerin diğer hücrelerden ayırt edilmesini sağlayacak boyama solüsyonu kullanıldı. Bu boyama metodunda hücrelerin steroidojenik faaliyetlerinden yararlandırıldı. İnkübasyon sırasında steroid sentezleyen luteal hücrelerin ihtiva ettiği 3β-HSD enzimi, kullanılan kimyasallar ile reaksiyona girmekte ve luteal hücrelerin koyu mavi-mor renk almasına sebep olmaktadır. Böylelikle luteal hücreler diğer hücrelerden rahatlıkla ayırt edilebilir hale gelmektedir.

Boyama işlemi özetle şu şekilde gerçekleştirildi; hazırlanan hücre süspansiyonundan 200 µl alınarak mikro tüpe aktarıldı ve 5 dakika süreyle santrifüj (500 g) edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı ve hücrelerin tespit edilmesi amacıyla %1'lik paraformaldehit çözeltisinden 1 ml ilave edilerek 20 dakika beklendi. Süre tamamlandığında mikrotüp, tespit olan hücrelerin paraformaldehitten arındırılması amacıyla iki defa santrifüj edilerek PBS ile yıkandı. Fikse olan hücrelerin üzerine özel boyama solüsyonundan [PBS içinde BSA (%0,1), NAD (1,5 mM), nitro blue tetrazolium (0,25mM), 5β-androstene-3β-ol-17 one (0,2 mM)] 200 µl ilave edildi. Mikro tüp, karanlık ortam oluşturulması amacıyla alüminyum folyoya sarıldı ve 4 saat süre ile 37 °C'de inkübe edildi. Süre dolduğunda mikro tüpün içindeki karışım yavaşça homojenize edilerek karışımdan 10 µl alındı ve Neubauer

lamında sayıldı. Sayım sonrasında yapılan hesaplamalarla, elde edilen süspansiyondaki steroidojenik aktiviteye sahip luteal hücrelerin sayısı belirlendi.

Hücre boyaması, inkübasyon süresince hücrelerin gelişme ve büyümelerinin gözlenmesi amacıyla pleyt üzerinde de gerçekleştirildi. Boyamalar inkübasyonun 1'inci ve 3'üncü günlerinde kontrol pleytları üzerinde, 5'inci gün kontrol pleyti dâhil bütün metal uygulanmış pleytlar üzerinde gerçekleştirildi. Pleyt üzerinde hücrelerin boyanması şu şekilde gerçekleştirildi; pleyt gözlerindeki medyum boşaltıldıktan sonra, pleyt gözleri PBS ile yıkandı ve 1 ml %1'lik parafomaldehit solüsyonundan ilave edilerek hücrelerin 20 dakika süreyle fiksasyonu sağlandı. Hücreler fikse olduktan sonra 2 defa PBS ile yıkandı ve üzerine 1 ml özel boyama solüsyonundan [PBS içinde BSA (%0,1), NAD (1,5 mM), nitro blue tetrazolium (0,25mM), 5 β -androstene-3 β -ol-17 one (0,2 mM)] ilave edildi. Pleytlar alüminyum folyoya sarılarak 4 saat süre ile 37 °C inkübe edildi. Boyama sonucunda, steroidojenik aktiviteye sahip hücrelerin koyu maviye boyanması ile, luteal hücrelerin yapışma ve büyümelerinin değerlendirilebilmesi için belirgin bir görüntü elde edildi.

2.2.5. İnkübasyon Sırasında Hücrelere Uygulanacak Ağır Metal Dozlarının Hazırlanması

Hücre kültürü ortamına uygulacak kadmiyum, kurşun ve cıvanın dozları, ön denemeler sonucu belirlendi. Uygulanacak üç metal de distile suda çözdürüldü ve 100 mM stok solüsyonları hazırlandı. Bunun için kadmiyum klorür 18,33 mg, kurşun asetat trihidrat 37,93 mg ve cıva klorür 27,15 mg tartılarak 1 ml distile su içinde çözdürüldü. Hazırlanan stok solüsyonlarından birkaç sulandırma işlemiyle ara dozlar elde edildi. Bu ara dozlardan belirli hacimlerde alınıp 100 katı hacme sahip medyuma ilave edildiğinde, hücrelere uygulanacak ağır metal içerikli medyum karışımı elde edildi.

Çalışmada kullanılan kurşun asetat trihidratın doz ayarlaması şu şekilde gerçekleştirildi; kurşun asetat trihidratın stok solüsyonununun birkaç sulandırma ile 5 000, 1 000, 100 ve 10 μ M ara dozlar elde edildi. Pleytların her gözüne 2 şer ml

medyum ilave edileceği ve her doz için 2 göz kullanılacağı hesap edildiğinde, her doz için en az 4 ml medyum gerekmektedir. Ayrıca medyum karışımının filtrelenmesi sırasında, filtre ve enjektörde kalacak medyum hesap edildi ve kaybın en fazla 0,5 ml olacağı belirlendi. Bundan dolayı söz konusu kayıp ta hesap edilerek her doz için 4,455 ml medyum tüplere (15 ml'lik falkon) bölündü. Sonrasında kurşun asetat trihidratın ara dozlarından (5 000, 1 000, 100 ve 10 μM) 45'şer μl tüplerin üzerine eklenerek, 4,5 ml medyum (ağır metal solüsyonu ilave edilmiş) karışımı elde edildi. Karışım 1 dakika vortekslendi. Sonuç olarak ara dozlar 100 kat seyrelerek 50, 10, 1 ve 0,1 μM kurşun asetat trihidrat içeren medyum karışımı hazırlandı. Ayarlanan dozların hepsinin de su içeriği %1 olduğundan, kontrol grubuna da %1 oranında distile su ilave edildi. Kadmiyum ve cıva da benzer şekilde sulandırılarak, kadmiyum klorürün 0,1; 0,25; 0,5; 1 μM ve cıva klorürün 1; 2,5; 5, 10 μM dozları elde edildi (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Kültür ortamına uygulanan metaller ve dozları.

Kadmiyum Klorür	Kurşun Asetat Trihidrat	Cıva Klorür
0,1 μM	0,1 μM	1 μM
0,25 μM	1 μM	2,5 μM
0,5 μM	10 μM	5 μM
1 μM	50 μM	10 μM

2.2.6. Hücrelerin İnkübasyonu

Hücrelerin inkübasyonu toplamda 5 gün süreyle gerçekleştirildi. İlk 24 saatlik süreçte, hücrelere herhangi bir işlem yapılmayarak sadece hücrelerin pleytin tabanına yapışması sağlandı. İlk inkübasyonun sonunda pleytlerdeki medyum, ağır metal ilave edilmiş medyum karışımı ile değiştirilerek 48 saat süreyle yeniden inkübe edildi. İkinci inkübasyonun sonunda kullanılan medyum hormon analizi için toplanıp saklandı ve pleytlere taze hazırlanmış ağır metal ilaveli inkübasyon medyumunu dağıtılarak 48 saat süreyle son kez inkübe edildi. 5. günün sonunda hücre ortamı

hormon analizi için toplanıp $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ de saklandı. Sonuç olarak luteal hücreler, 48'er saatlik periyotlarda olmak üzere 3. ve 5. günlerde iki defa ağır metale maruz bırakılmış oldu.

Hücre inkübasyonu 6 kuyucuklu hücre kültürü pleytlerinde gerçekleştirildi. İnkübasyon için gerekli olan toplam medyum karışımının hesabı, bir pleyt gözünü 2 ml gelecek şekilde yapıldı. Örneğin çalışmada 5 pleyt kullanılacaksa, $5 \times 6 \times 2 = 60$ ml medyum karışımı gerekmektedir.

Hazırlanması gereken medyum karışımı hesap edildikten sonra ilk 24 saatlik inkübasyon için, belirli bir hacimdeki medyum (15 mM HEPES içeren Dulbecco's Modified Eagle's and HAM's F-12 nin bire bir karışımı) steril bir şişeye aktarıldı ve üzerine %8 oranında newborn calf serum (NCS) ve %1 oranında antibiyotik-antimikotik solüsyonu ilave edildi. Karışım iyice çalkalandıktan sonra pleytlerin gözüne ikişer ml aktarıldı. Hazırlanmış olan hücre süspansiyonundan pleytlerin her gözüne 100 μl ekildikten sonra, pleytler inkübasyon için $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye sabitlenmiş karbondioksitli etüve 24 saatliğine kaldırıldı. Karışıma katılan NCS sayesinde, hücreler pleytin tabanına yapışmakta ve böylelikle medyum değişiminde hücre kaybı önlenmektedir.

İlk 24 saatlik inkübasyondan sonra, hücrelerin ekildiği besi ortamı yeni hazırlanan ağır metal içerikli inkübasyon medyumunu ile değiştirilerek deneysel muamelelere başlandı. Ancak bu kültür medyumuna NCS yerine %1 oranında ITS premiksi (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ insulin, 5,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ transferrin ve 5 ng/ml sodyum selenit) eklendi. Ayrıca bu medyum karışımına 22(R)-hidroksikolesterol de (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) eklendi. Kolesterol steroid sentezinde hammadde olarak kullanıldığı için luteal hücrelerin faaliyetleri sırasında gerekmektedir.

Çalışmada hücre kültürü denemeleri her metal için 4 kez tekrarlandı ve her tekrarda dozların her biri için pleytin 2 kuyucuğu kullanıldı. Sonuç olarak kültür ortamına uygulanan her bir doz için, hormon analizini gerçekleştirmek üzere 8 ayrı numune elde edildi.

2.2.7. Hormon Analizi

Hormon analizi gama sayacında progesteron kitleri kullanılarak yapıldı. Analizler kiti üreten firmanın hazırladığı protokole göre gerçekleştirildi. Öncelikle numunelerin her biri için, ayrıca kalibrasyon ve kontrol için 12x75mm boyutlarındaki yüzeyi antikorla kaplanmış tüpler etiketlendi. Total count 1 ve 2 için antikorla kaplanmamış plastik tüpler etiketlendi. Numunelerin her biri, RIA kitinin ölçüm aralığında olması amacıyla 30 kat sulandırıldı. Sulandırılmış numuneler, kontrol ve kalibrasyon sıvıları vorteksledikten sonra, her birinden kendisi için etiketlenen tüpe 50 µl aktarıldı. Her bir tüpün üzerine, total count 1 ve 2 dâhil olmak üzere 500 µl tracer eklendi. Tüpler ağzı kapatılıp çoklu karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra, 24 °C'ye ve 200 g'ye sabitlenmiş su banyosuna bir saatliğine kaldırıldı. Su banyosundan alınan tüplerin (total count tüpleri hariç) içindeki radyoaktif karışım, radyoaktif atık torbasına boşaltıldı. İçi boşaltılan tüpler, radyoaktif maddeden arındırılması amacıyla kurutma kâğıtları serilmiş alana ters çevrilerek 2 dakika süreyle bırakıldı. Tüpler son olarak gamma sayacı cihazına yerleştirildi ve 50 saniye süreyle ölçümleri yapıldı. Kayıt edilen sonuçlar AssayZap (Biosoft/United Kingdom) grafik programı kullanılarak ng/ml'ye dönüştürüldü.

2.2.8. İstatistiksel Analiz

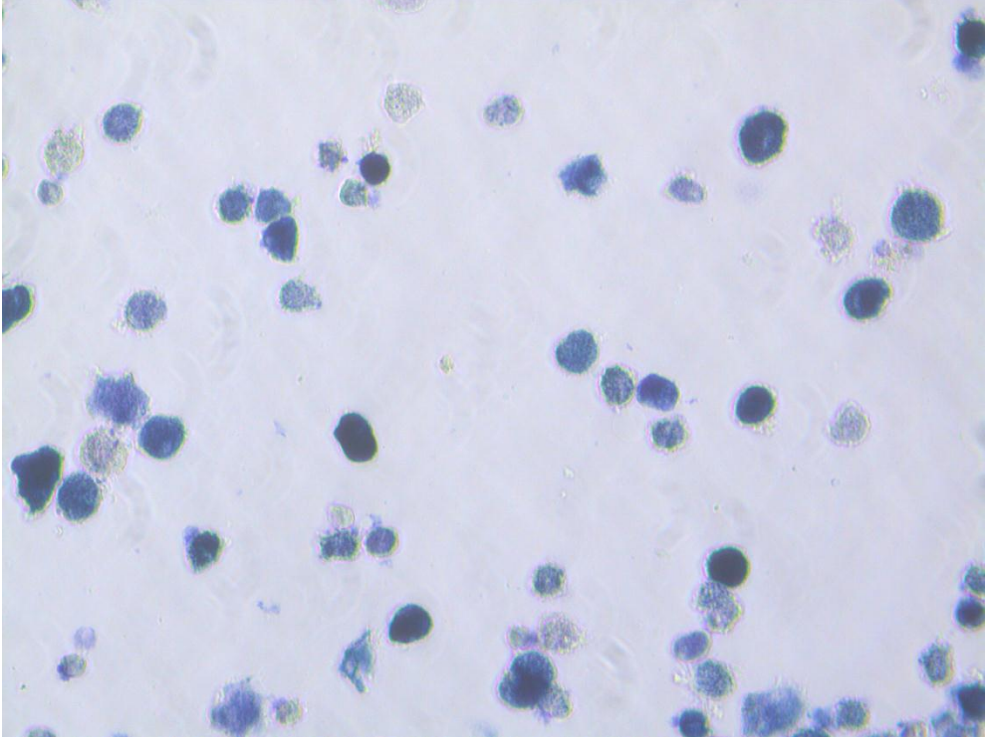
Verilerin istatistiksel analizi SAS programının (8.02 Inst. Cary NC. USA) General Linear Model prosedürü kullanılarak (PROC GLM) yapıldı. Gruplar arası farklılıklarda önemliliğin kontrolü için Tukey testi uygulandı. İstatistiksel değerlendirmede $p < 0.01$ düzeyi, anlamlı farklılığın göstergesi olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

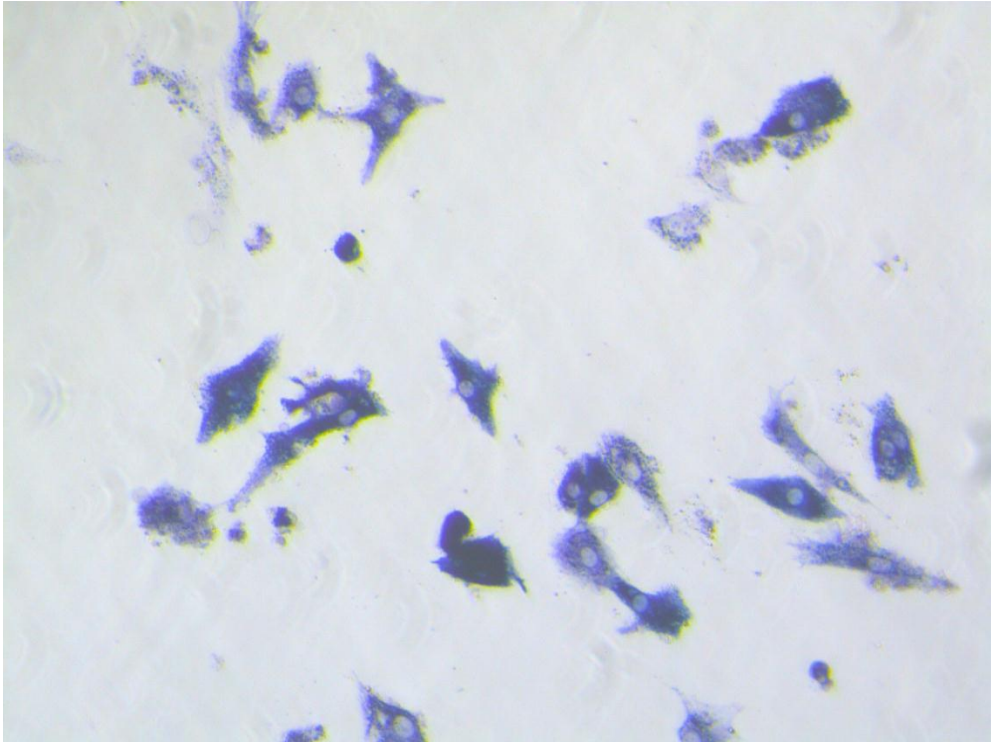
3.1. Hücre Boyaması

Hücreler kültür öncesi, devamı ve sonrasında, steroid sentezleyen hücelere özgü 3 β -HSD enziminin aktivitesinden faydalanılarak boyandı. Hücrelerin mavi-mor renk alması steroidojenik aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Hücreler izole edildikten sonra boyandı ve Şekil 3.1’de görüldüğü gibi, hatlarının yuvarlak ve düzgün olduğu gözlemlendi. İnkübasyon sırasında yapılan boyamalarda ise, hücrelerin Şekil 3.2, 3.3 ve 3.4’te görüldüğü gibi pleytin tabanına yapışıp büyüdüğü ve çevresindeki diğer hücelerle iletişim kurduğu görüldü. Mevcut çalışmada hücrelerin gelişiminin takip edilmesi amacıyla, her deneyin inkübasyonun 1 ve 3. günlerinde kontrol pleytleri ve 5. günde bütün pleytler boyandı. Bu boyama sonucunda hücrelerin pleytin tabanına yapışması, büyümesi, komşu hücelerle bağlantı kurması ve boyanma derecesi kontrol edilerek değerlendirildi. İnkübasyonun 1. gününde yapılan değerlendirmeye göre deneyin devam edip etmeyeceğine karar verildi. Eğer hücre gelişimi sağlıklı değilse, inkübasyona devam edilmeyerek deneme sonlandırıldı.

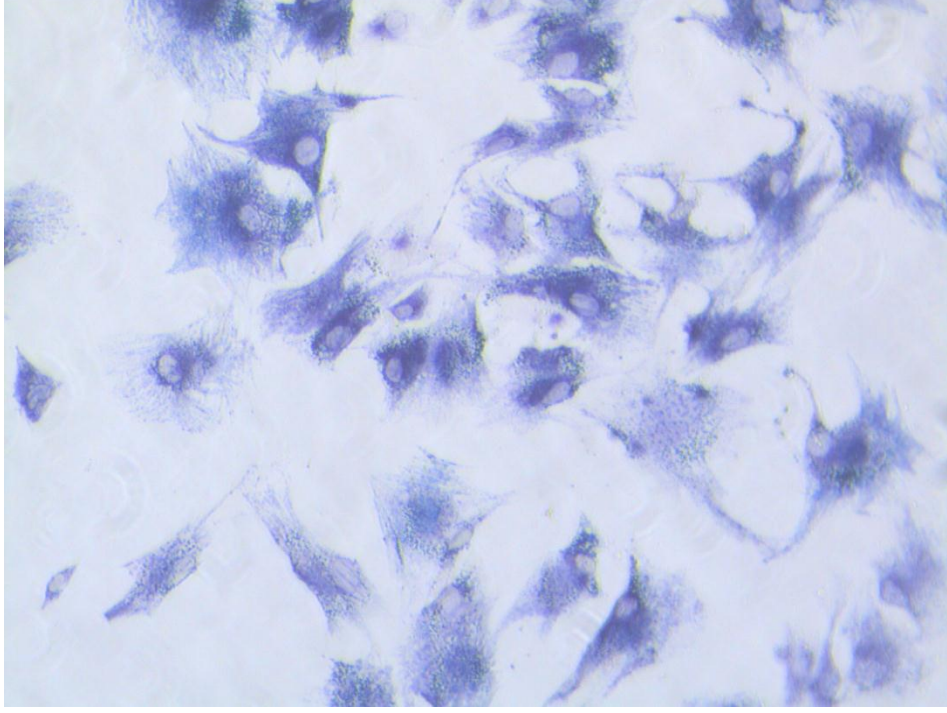
Mevcut çalışmada deneyler 5 günlük inkübasyonun ardından sonlandırıldığında, her deneyin kontrol ve doz grupları boyandı. Boyama sonucunda yüksek dozda ağır metale maruz kalan hücelerin (Şekil 3.5, 3.6, 3.7), kontrole oranla daha açık boyandığı gözlemlendi.



Şekil 3.1. İnkübasyon öncesi boyanmış luteal hücrelerin görüntüsü (X20).



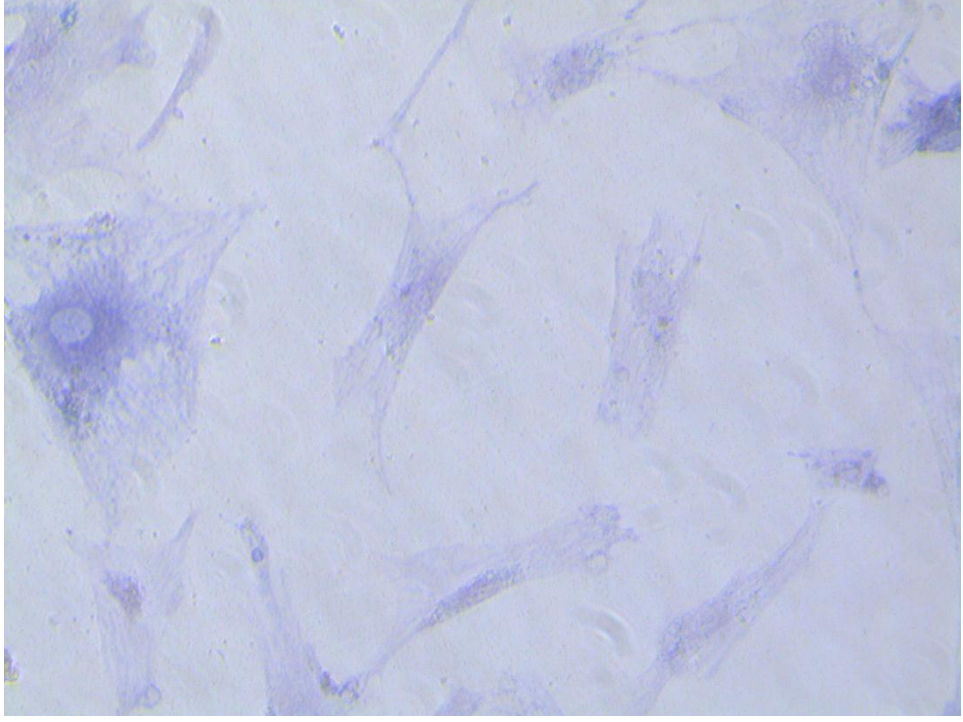
Şekil 3.2. İnkübasyonun birinci gününde kontrol grubuna ait hücrelerin, kültür pleyti tabanında boyanmış görüntüsü (X20).



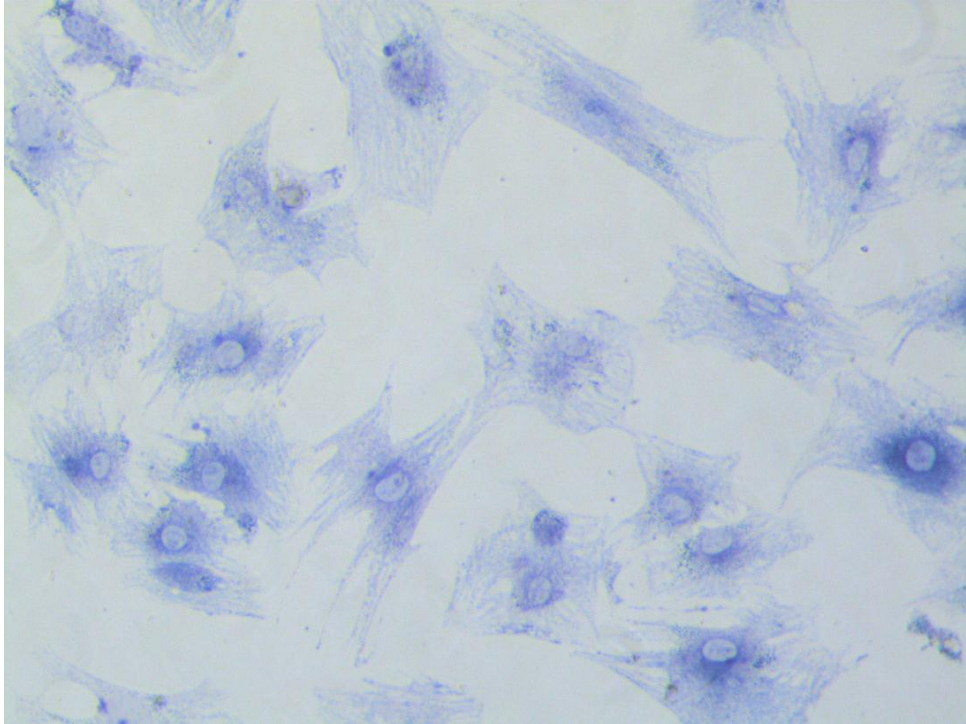
Şekil 3.3. İnkübasyonun üçüncü gününde kontrol grubuna ait hücrelerin, kültür pleyti tabanında boyanmış görüntüsü (X20).



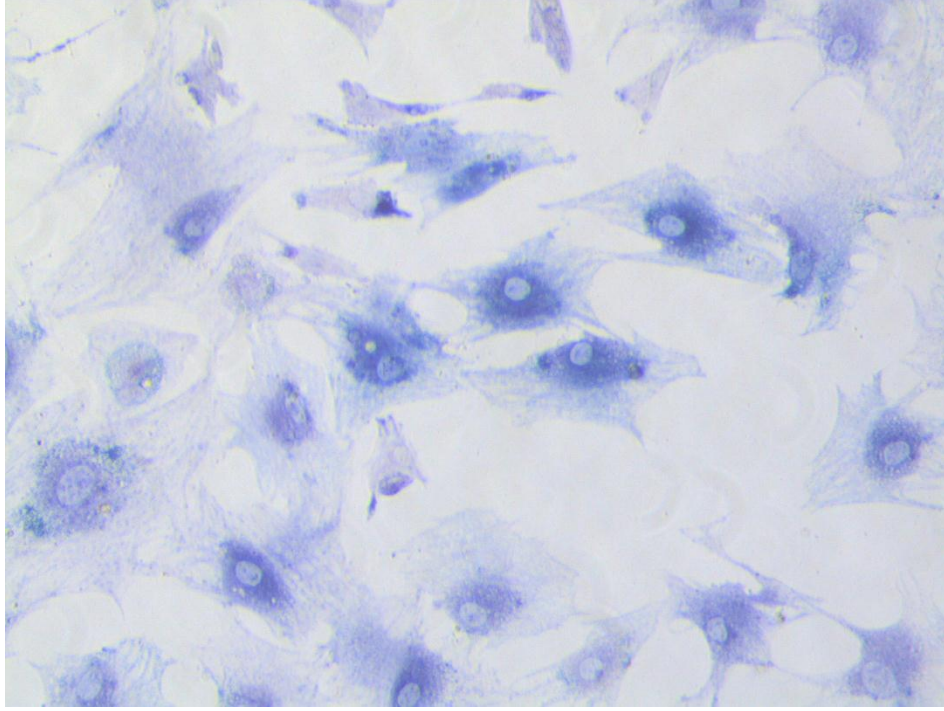
Şekil 3.4. İnkübasyon bitiminde (5. gün) kontrol grubuna ait hücrelerin, kültür pleyti tabanında boyanmış görüntüsü. (X20).



Şekil 3.5. İnkübasyon bitiminde (5. gün) yüksek doz ($1 \mu\text{M}$) kadmiyum grubuna ait hücrelerin, kültür pleyti tabanında boyanmış görüntüsü (X20).



Şekil 3.6. İnkübasyon bitiminde (5. gün) yüksek doz ($50 \mu\text{M}$) kurşun grubuna ait hücrelerin, kültür pleyti tabanında boyanmış görüntüsü (X20).



Şekil 3.7. İnkübasyon bitiminde (5. gün) yüksek doz (10 μ M) cıva grubuna ait hücrelerin, kültür pleyti tabanında boyanmış görüntüsü (X20).

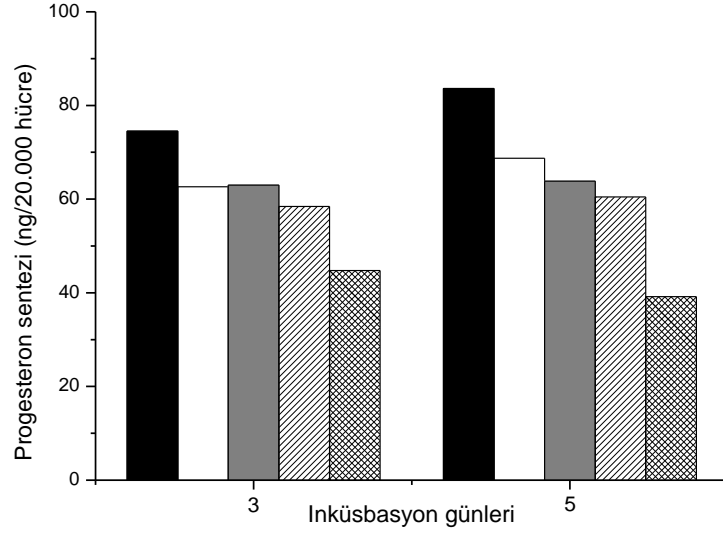
3.2. Hormon Analizi Bulguları

Mevcut çalışmada kadmiyum klorür, kurşun asetat trihidrat ve cıva klorürün luteal hücreler tarafından sentezlenen progesteron üzerine etkisi araştırıldı. Çalışma, 3 ve 5 günlük inkübasyon periyotları şeklinde tasarlanmıştır. Çalışmada hücrelere ilk gün metal uygulaması yapılmadığı için, 3 günlük inkübasyon sürecinde hücreler 48 saat süreyle ağır metale maruz kalmışlardır. Üçüncü günün sonunda kullanılmış medyum mikrotüplere toplanarak $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de hormon analizi yapılincaya kadar saklanmıştır. Üçüncü günde pleytlerdeki kullanılmış medyum toplandıktan sonra, yerine yeni hazırlanmış ağır metal ilaveli inkübasyon medyumunu aktararak 48 saat süreyle tekrar inkübe edilmiştir. Beşinci günün sonunda pleytlerdeki kullanılmış medyum toplanıp $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye kaldırılmıştır. Pleyt içindeki medyum boşaltıldıktan sonra, pleytlerde bulunan hücreler özel boyama yöntemiyle boyanmıştır.

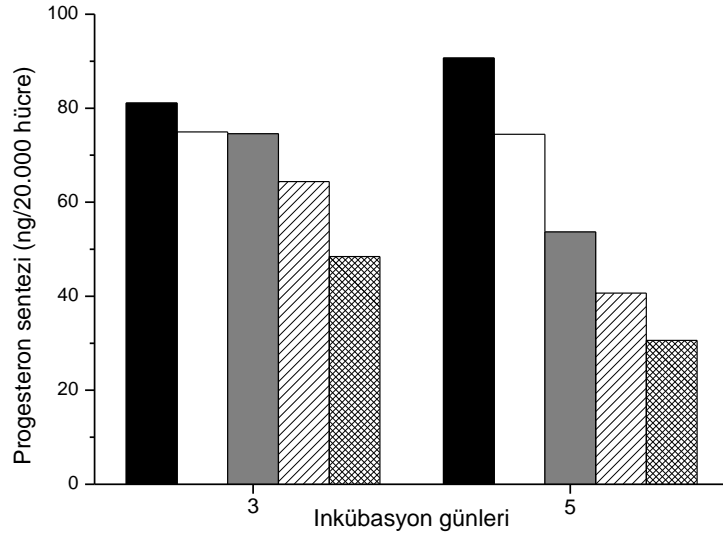
3.2.1. Kadmiyum Klorürün Steroid Sentezi Üzerine Etkisi

Çalışmada kadmiyum klorürün luteal progesteron sentezine etkisi çalışıldı. Deneyler dört kez tekrarlandı ve bütün deneylerde kadmiyumun artan dozlarında progesteron sentezinin etkilendiği gözlemlendi. Bireysel olarak dört deneyin sonuçları Şekil 3.8, 3.9, 3.10 ve 3.11’de gösterilmiştir. Dört deneyin istatistiki analizi yapıldığında, kadmiyum klorürün progesteron sentezi üzerine etkisi, kontrol grubuna kıyasla bütün dozlarda istatistiki açıdan önemli ($P<0,004$) görüldü (Şekil 12). Özellikle 1 μM kadmiyum uygulamasının 3. gün sonunda progesteron sentezini, kontrole kıyasla %50 oranında 5. gün sonunda ise %55 oranında düşürdüğü gözlemlendi (Şekil 3.12).

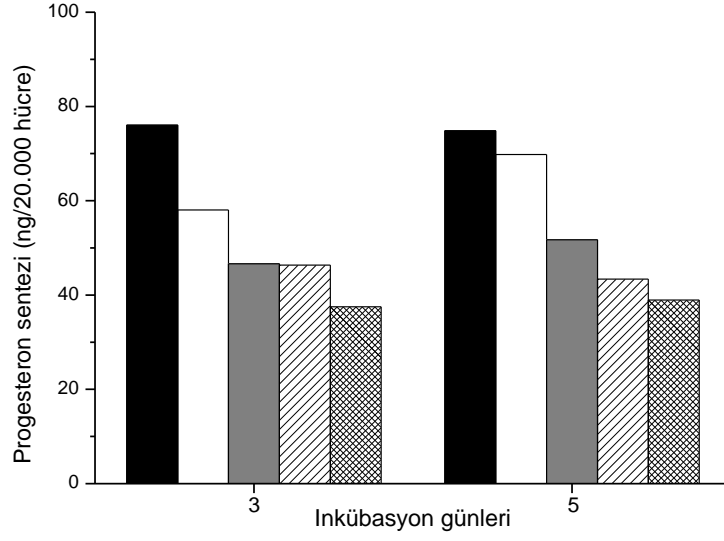
Mevcut çalışmada ilk 3 günlük inkübasyonda, ağır metal uygulanmış grupların sonuçlarının kontrole daha yakın olduğu gözlemlenmiştir. Hücrelere yapılan ikinci muamelede, yani 5 günlük inkübasyonda ise ağır metalin progesteron sentezini azaltıcı etkisi daha bariz ortaya çıkmıştır.



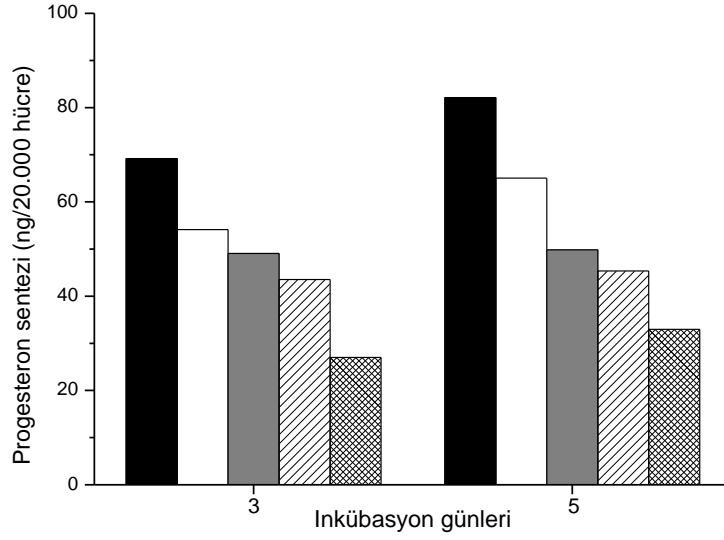
Şekil 3.8. Kadmiyum klorürün luteal hücrelerde progesteron sentezine etkisinin araştırıldığı birinci deneme sonuçları (n=2). Kontrol (■); 0,1 µM Kadmiyum Klorür (□); 0,25 µM Kadmiyum Klorür (■); 0,5 µM Kadmiyum Klorür (▨); 1 µM Kadmiyum Klorür (▩).



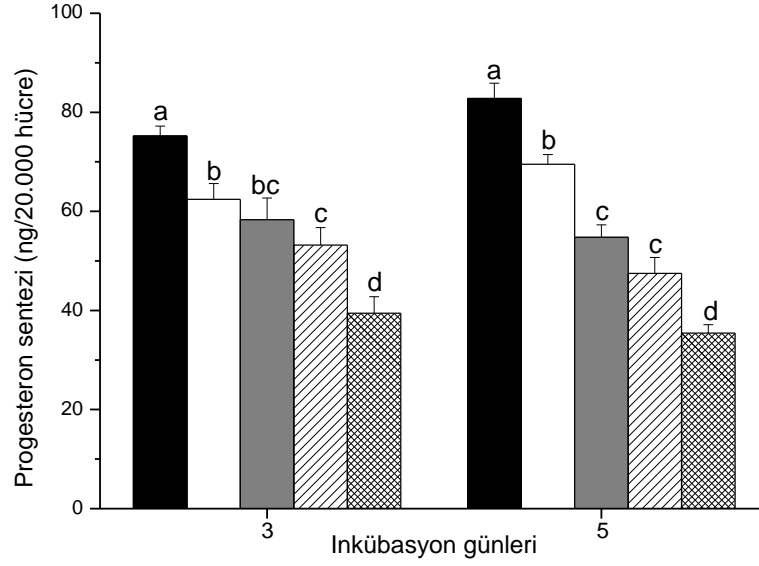
Şekil 3.9. Kadmiyum klorürün luteal hücrelerde progesteron sentezine etkisinin araştırıldığı ikinci deneme sonuçları (n=2). Kontrol (■); 0,1 µM Kadmiyum Klorür (□); 0,25 µM Kadmiyum Klorür (■); 0,5 µM Kadmiyum Klorür (▨); 1 µM Kadmiyum Klorür (▩).



Şekil 3.10. Kadmiyum klorürün luteal hücrelerde progesteron sentezine etkisinin araştırıldığı üçüncü deneme sonuçları (n=2). Kontrol (■); 0,1 µM Kadmiyum Klorür (□); 0,25 µM Kadmiyum Klorür (■); 0,5 µM Kadmiyum Klorür (▨); 1 µM Kadmiyum Klorür (▩).



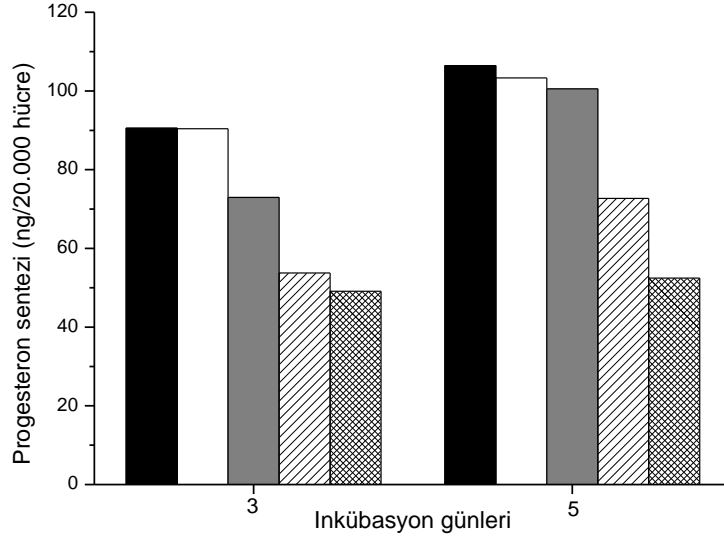
Şekil 3.11. Kadmiyum klorürün luteal hücrelerde progesteron sentezine etkisinin araştırıldığı dördüncü deneme sonuçları (n=2). Kontrol (■); 0,1 µM Kadmiyum Klorür (□); 0,25 µM Kadmiyum Klorür (■); 0,5 µM Kadmiyum Klorür (▨); 1 µM Kadmiyum Klorür (▩).



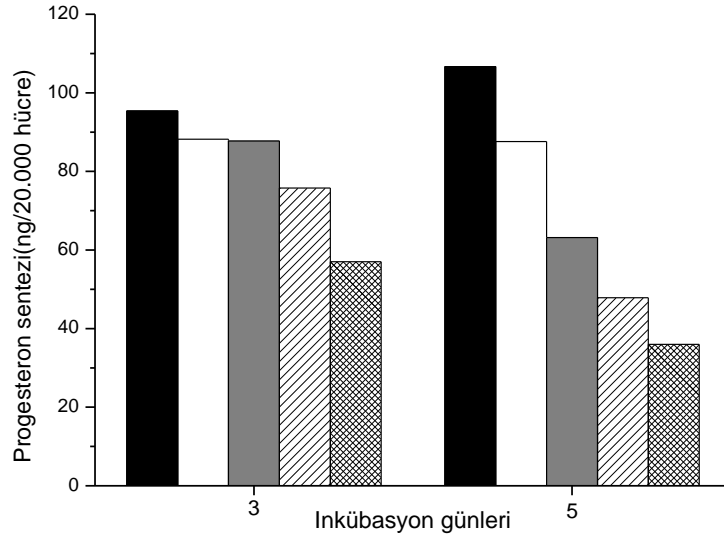
Şekil 3.12. Kadmiyum klorürün luteal hücrelerde progesteron sentezine etkisinin araştırıldığı dört denemenin ortalama sonuçları (n=8). Kontrol (■); 0,1 μM Kadmiyum Klorür (□); 0,25 μM Kadmiyum Klorür (▒); 0,5 μM Kadmiyum Klorür (▨); 1 μM Kadmiyum Klorür (▩). Kontrol dâhil bütün gruplara kolesterol (10 μg/ml 22R-HC) ilavesi yapıldı. Veriler ortalama ve standart hata olarak gösterildi. Aynı inkübasyon günlerinde, farklı harflerle gösterilen veriler arasındaki farklılık, istatistiksel açıdan önemlidir (P<0,004).

3.2.2. Kurşun Asetat Trihidratın Steroid Sentezi Üzerine Etkisi

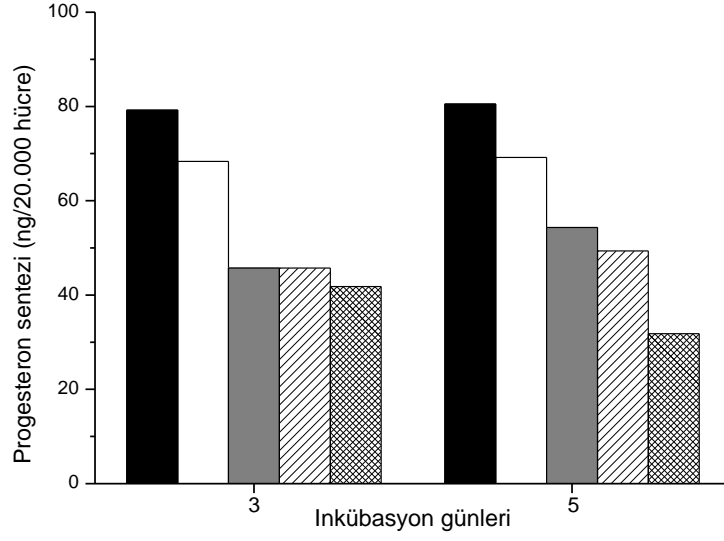
Çalışmada, kurşun asetat trihidratın 0,1; 1, 10 ve 50 μM dozlarının luteal progesteron sentezi üzerine etkisi çalışıldı. Deneyler dört kez tekrarlandı ve bütün deneylerde kurşunun artan dozlarında progesteron sentezini etkilediği gözlemlendi. Bireysel olarak dört deneyin sonuçları Şekil 3.13, 3.14, 3.15 ve 3.16'da gösterilmiştir. Dört deneyin ortalaması alınıp istatistiksel analizi yapıldığında, kurşunun progesteron sentezi üzerine etkisi, 3. ve 5. gün sonunda 1 μM üstü dozlarda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel açıdan önemli (P<0,003) görüldü (Şekil 3.17). Kurşun en yüksek dozda (50 μM) uygulandığında 3. gün sonunda progesteron sentezinin, kontrole kıyasla %43 oranında, 5. gün sonunda ise %61 oranında azaldığı gözlemlendi (Şekil 3.17).



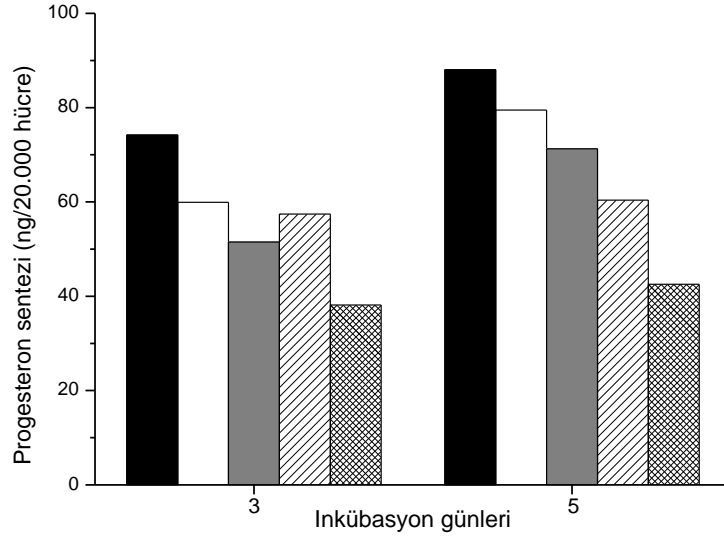
Şekil 3.13. Kurşun asetat trihidratın luteal hücrelerde progesteron sentezine etkisinin araştırıldığı birinci deneme sonuçları (n=2). Kontrol (■); 0,1 μM Kurşun Asetat Trihidrat (□); 1 μM Kurşun Asetat Trihidrat (■); 10 μM Kurşun Asetat Trihidrat (▨); 50 μM Kurşun Asetat Trihidrat (▩).



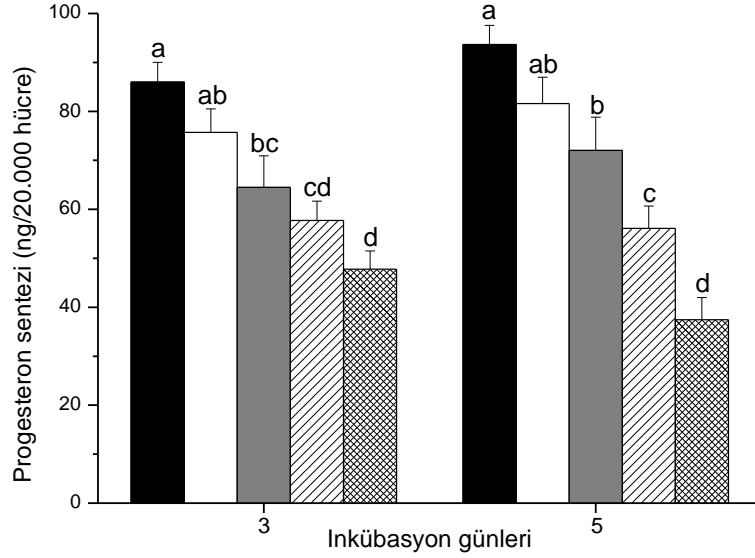
Şekil 3.14. Kurşun asetat trihidratın luteal hücrelerde progesteron sentezine etkisinin araştırıldığı ikinci deneme sonuçları (n=2). Kontrol (■); 0,1 μM Kurşun Asetat Trihidrat (□); 1 μM Kurşun Asetat Trihidrat (■); 10 μM Kurşun Asetat Trihidrat (▨); 50 μM Kurşun Asetat Trihidrat (▩).



Şekil 3.15. Kurşun asetat trihidratın luteal hücrelerde progesteron sentezine etkisinin araştırıldığı üçüncü deneme sonuçları (n=2). Kontrol (■); 0,1 µM Kurşun Asetat Trihidrat (□); 1 µM Kurşun Asetat Trihidrat (■); 10 µM Kurşun Asetat Trihidrat (▨); 50 µM Kurşun Asetat Trihidrat (▩).



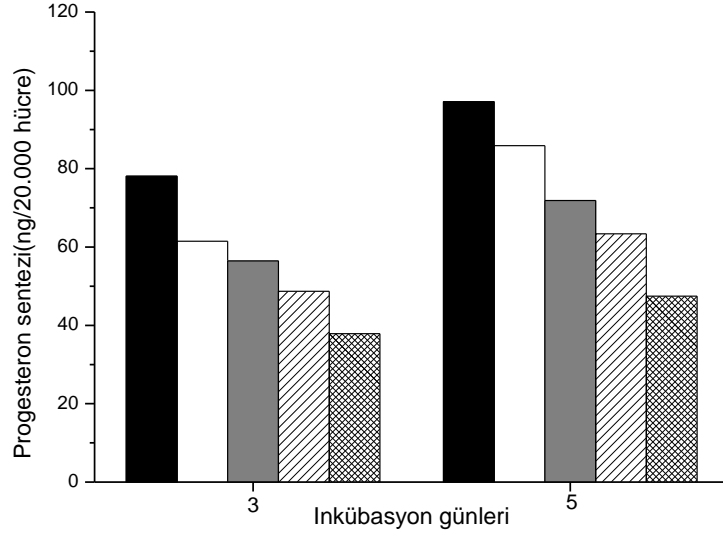
Şekil 3.16. Kurşun asetat trihidratın luteal hücrelerde progesteron sentezine etkisinin araştırıldığı dördüncü deneme sonuçları (n=2). Kontrol (■); 0,1 µM Kurşun Asetat Trihidrat (□); 1 µM Kurşun Asetat Trihidrat (■); 10 µM Kurşun Asetat Trihidrat (▨); 50 µM Kurşun Asetat Trihidrat (▩).



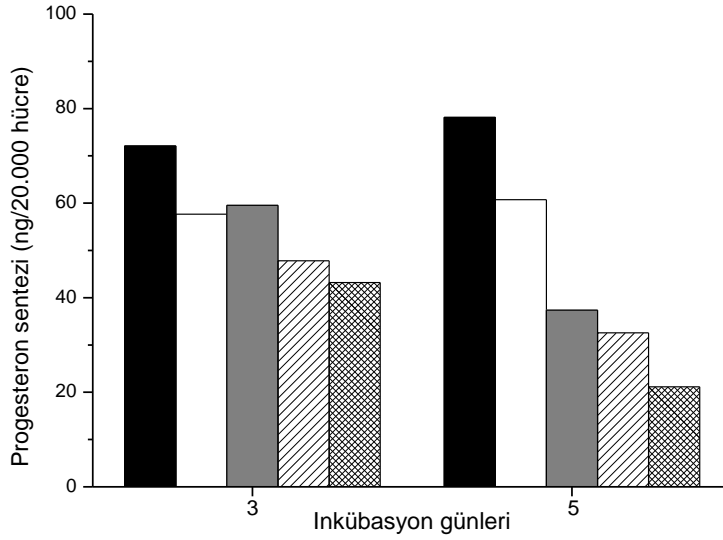
Şekil 3.17. Kurşun asetat trihidratın luteal hücrelerde progesteron sentezine etkisinin araştırıldığı dört denemenin ortalama sonuçları (n=8). Kontrol (■); 0,1 μM Kurşun Asetat Trihidrat (□); 1 μM Kurşun Asetat Trihidrat (▒); 10 μM Kurşun Asetat Trihidrat (▨); 50 μM Kurşun Asetat Trihidrat (▩). Kontrol dâhil bütün gruplara kolesterol (10 μg/ml 22R-HC) ilavesi yapıldı. Veriler ortalama ve standart hata olarak gösterildi. Aynı inkübasyon günlerinde, farklı harflerle gösterilen veriler arasındaki farklılık, istatistiksel açıdan önemlidir (P<0,003).

3.2.3. Cıva Klorürün Steroid Sentezi Üzerine Etkisi

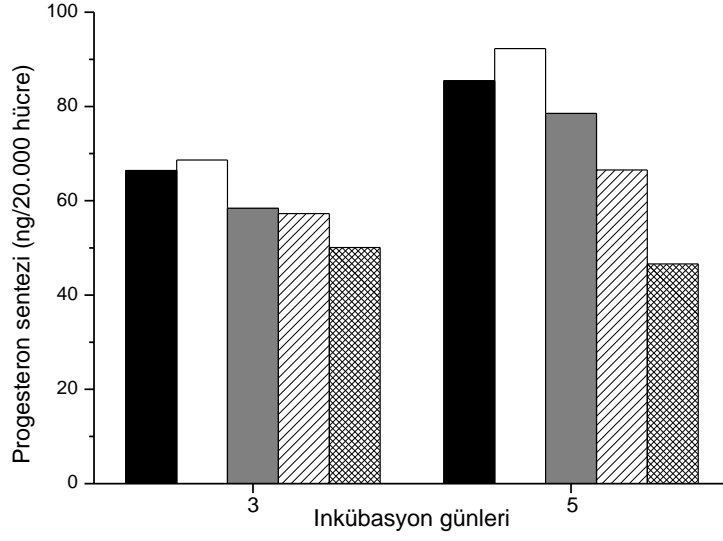
Çalışmada, cıva korürün artan dozlarının (1; 2,5; 5 ve 10 μM) luteal progesteron sentezi üzerine etkisi araştırıldı. Deneyler dört kez tekrarlandı ve bütün deneylerde cıvanın artan dozlarında progesteron sentezinin önemli oranda düşürdüğü gözlemlendi. Yapılan bireysel deneylerin sonuçları Şekil 3.18, 3.19, 3.20 ve 3.21’de gösterilmiştir. Dört deneyin ortalaması alınıp sonuçlar değerlendirildiğinde, cıvanın artan dozlarında progesteron miktarının önemli oranda azaldığı gözlenmiştir. Bu düşüş inkübasyonun 3. ve 5. günlerinde 2,5 μM ve üstü dozlarda kontrol grubuna kıyasla istatistiki açıdan önemli (P<0,01) görülmüştür (Şekil 3.22). Cıvanın uygulanan en yüksek dozunun (10 μM), inkübasyonun 3. gününde progesteron sentezini %42 oranında, inkübasyonun 5. gününde ise %54 oranında düşürdüğü gösterilmiştir (Şekil 3.22).



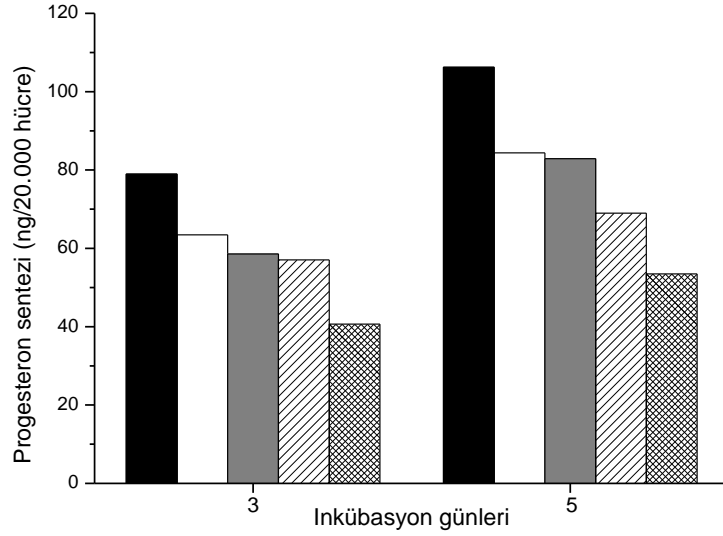
Şekil 3.18. Cıva klorürün luteal hücrelerde progesteron sentezine etkisinin araştırıldığı birinci deneme sonuçları (n=2). Kontrol (■); 1 µM Cıva Klorür (□); 2,5 µM Cıva Klorür (■); 5 µM Cıva Klorür (▨); 10 µM Cıva Klorür (▩).



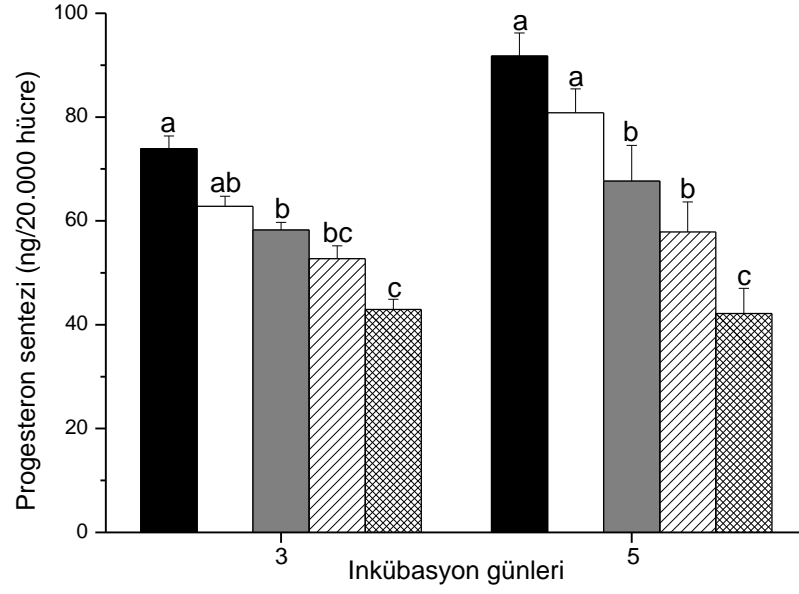
Şekil 3.19. Cıva klorürün luteal hücrelerde progesteron sentezine etkisinin araştırıldığı ikinci deneme sonuçları (n=2). Kontrol (■); 1 µM Cıva Klorür (□); 2,5 µM Cıva Klorür (■); 5 µM Cıva Klorür (▨); 10 µM Cıva Klorür (▩).



Şekil 3.20. Cıva klorürün luteal hücrelerde progesteron sentezine etkisinin araştırıldığı üçüncü deneme sonuçları (n=2). Kontrol (■); 1 µM Cıva Klorür (□); 2,5 µM Cıva Klorür (■); 5 µM Cıva Klorür (▨); 10 µM Cıva Klorür (▩).



Şekil 3.21. Cıva klorürün luteal hücrelerde progesteron sentezine etkisinin araştırıldığı dördüncü deneme sonuçları (n=2). Kontrol (■); 1 µM Cıva Klorür (□); 2,5 µM Cıva Klorür (■); 5 µM Cıva Klorür (▨); 10 µM Cıva Klorür (▩).



Şekil 3.22. Cıva klorürün luteal hücrelerde progesteron sentezine etkisinin araştırıldığı dört denemenin ortalama sonuçları (n=8). Kontrol (■); 1 μ M Cıva Klorür (□); 2,5 μ M Cıva Klorür (■); 5 μ M Cıva Klorür (▨); 10 μ M Cıva Klorür (▩). Kontrol dâhil bütün gruplara kolesterol (10 μ g/ml 22R-HC) ilavesi yapıldı. Veriler ortalama ve standart hata olarak gösterildi. Aynı inkübasyon günlerinde, farklı harflerle gösterilen veriler arasındaki farklılık, istatistiksel açıdan önemlidir ($P<0,01$).

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Önemli çevre kirleticilerinden olan ağır metallerin üreme sistemi üzerine olumsuz etkileri olduğuna dair birçok çalışma yapılmıştır. Sınırlı sayıda olmakla birlikte, dişi üreme fizyolojisinin önemli kısmını oluşturan ovaryum steroidogenesizi üzerine ağır metallerin etkilerinin araştırıldığı çalışmalar da mevcuttur. Fakat bu çalışmalar genellikle granuloza hücrelerini kapsamakta olup, luteal hücre üzerinde çalışılan sadece bir araştırmaya ulaşılabilmektedir. Söz konusu araştırma farklı bir tür olan ratlar üzerinde yapılmış olup, çalışma kapsamında sadece kadmiyumun etkisine bakılmıştır (Paksy ve ark. 1992). Dolayısıyla tasarlanan tez çalışması inek luteal hücre kültüründe kadmiyum, kurşun ve cıvanın progesteron sentezi üzerine etkilerinin araştırıldığı ilk çalışma olma özelliğine sahiptir. Çalışmanın ekonomik açıdan önemli bir değer teşkil eden sığır ırkı üzerinde gerçekleştirilmiş olması ayrıca önem arz etmektedir.

Çevre kirliliği unsurlarına bağlı sağlık sorunlarının meydana gelmesinde en önemli nokta, bu faktörlere ne oranda maruz kalındığıdır. Birçok çalışmayla kadmiyum, kurşun ve cıvanın toksik dozları belirlenmeye çalışılmıştır. Araştırmacılar bu tespitlere göre hava, su ve gıda vasıtasıyla alınabilecek ve tolere edilebilecek maksimum miktarları belirlemişlerdir (EPA 2009, ATSDR 2013). Fakat her geçen gün yapılan yeni araştırmaların sonuçları doğrultusunda bu limitler, daha da aşağı çekilebilmektedir. Bu yönüyle bakıldığında, çevre kirliliği etmenlerinin sağlık üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda kullanılan etken maddelerin dozları ve maruziyet süresi önem arz etmektedir. Kadmiyum, kurşun ve cıvanın steroid sentezine etkisinin araştırıldığı çalışmalar incelendiğinde, kullanılan ağır metal dozlarının çok değişken olduğu gözlenmiştir (Paksy ve ark. 2001, Zhang ve Jia 2007, Roychoudhury ve ark. 2015). Mevcut araştırmada kullanılan dozlar, şimdiye kadar bu alanda yapılan çalışmalar arasında kullanılan en düşük dozlardır. Bu araştırmanın sonucunda, kullanılan metal dozlarının progesteron sentezini önemli oranlarda düşürdüğü tespit edilmiştir. Bu yönüyle mevcut çalışma kadmiyum, kurşun ve cıvanın, daha önceki araştırmacılar tarafından bildirilen dozlardan çok daha düşük dozlarda bile steroid sentezini negatif yönde etkileyebildiğini göstermektedir.

Progesteron, üreme hormonları arasında önemli bir konuma sahiptir. Progesteronun en önemli salınım yeri, korpus luteum ve eğer gebelik şekillenirse plasentadır. Progesteron az miktarda adreneal korteks, testisler ve ovaryumdaki foliküllerden de salınmaktadır. Progesteronun gebeliğin devamı, üreme sikluslarının oluşumu, ovaryum foliküllerinin gelişimi ve ovulasyonun meydana gelmesinde önemli vazifeleri vardır (Graham ve Clarke 1997, Yılmaz 1999). Progesteron hormonunun sentez ve salınımını kısıtlayacak herhangi bir faktör, üreme fizyolojisinde çeşitli problemlerin oluşumuna yol açacaktır. Bu yönüyle, üreme fizyolojisinde önemli görevleri bulunan progesteron hormonunu etkileyen faktörlerin tespiti son derece önemlidir. Bu alanda yapılan birkaç çalışmada, ağır metallerin progesteron sentezini etkilediği gösterilmiştir (Jolibois ve ark. 1999, Paksy ve ark. 2001, Zhang ve Jia 2007). Fakat in vitro olarak luteal hücre kültüründe bu metallerin progesteron sentezine etkisi neredeyse hiç araştırılmamıştır. Sadece bir çalışmada, rat luteal hücre kültüründe kadmiyumun etkisi araştırılmıştır (Paksy ve ark. 1992). Mevcut çalışmada kadmiyum, kurşun ve cıvanın luteal progesteron sentezini önemli ölçüde düşürdüğüne gösterilmesi, üreme açısından önem arz etmektedir. Bu metallerin oldukça düşük dozlarda bile üreme sağlığı için çok önemli olan progesteron sentezini olumsuz yönde etkilemesi, üreme problemlerinin kaynağına bir açıdan ışık tutmaktadır.

Tez çalışmasında kadmiyum, kurşun ve cıvanın inek luteal hücre kültüründe progesteron sentezi üzerine etkileri araştırıldı. Etkisi araştırılan bu üç metalin, doz artışıyla orantılı olarak progesteron sentezini önemli derecede düşürdüğü tespit edildi. Çalışmada kadmiyum klorürün 0,1; 0,25; 0,5 ve 1 μ M dozları kullanıldı ve 1 μ M doz uygulanmış grupta progesteron sentezinde 5'inci günde %55 oranında azalma tespit edildi. Kurşun asetat trihidratın 0,1; 1, 10 ve 50 μ M dozları kullanıldı ve 5. günde en yüksek dozun (50 μ M) progesteron miktarını %61 oranında düşürdüğü belirlendi. Çalışmada cıva klorürün 1; 2,5; 5 ve 10 μ M dozları kullanıldı ve 5. günde 10 μ M doz uygulanmış grupta sentezlenen progesteron miktarında %54 oranında azalma meydana geldiği tespit edildi. Çalışmaların sonuçları değerlendirildiğine, kadmiyumun çok daha düşük dozlarda bile progesteron miktarını önemli ölçüde düşürdüğü gözlenmektedir. Bu açıdan bakıldığında etkisi araştırılan

ağır metaller arasında, steroid sentezini en fazla etkileyen metalin kadmiyum olduğu söylenbilir.

Tez çalışmasında, deneyler sonlandırıldıktan sonra bütün pleytler boyandı. Boyama sonucunda yüksek dozda ağır metale maruz kalan hücrelerin, kontrol hücrelerine kıyasla daha açık boyandığı gözlendi. Kontrol ve doz gruplarının boyanma derecesindeki bu farklılık, hormon analizi sonuçlarını da desteklemektedir. Yüksek dozda ağır metale maruz kalmış hücrelerin progesteron sentezinin %54-61 oranında düştüğü tespit edilmiştir. Boyama metodunda kullanılan kimyasallar, steroid sentezinde görevli 3β-HSD enzimi ile reaksiyona girerek hücrelerde renk değişimine yol atığından, ağır metal uygulanmış hücrelerdeki 3β-HSD enziminin sentezinde meydana gelen azalmaya bağlı olarak hücrelerin daha açık boyanmış olabileceği düşünülmektedir.

Mevcut çalışmada kültür ortamına ilave edilen kadmiyum klorürün doz artışına paralel olarak progesteron miktarını önemli oranda düşürdüğü belirlenmiştir. Çalışmada, kullanılan en yüksek dozun (1 μM), progesteron sentezini 5. günün sonunda, %55 oranında düşürdüğü tespit edilmiştir. Bu sonuçlar Paksy ve ark. (1992) tarafından rapor edilen çalışmanın sonucuyla benzerlik göstermektedir. Fakat mevcut çalışmada uygulanan kadmiyum dozları, rapor edilen çalışmada kullanılan dozlardan önemli derecede düşüktür. Söz konusu çalışmada, gebe rat ovaryumlarından hazırlanan luteal hücre kültüründe progesteron sentezi üzerine kadmiyumun etkisi araştırılmıştır. Kadmiyum klorürün 27, 54, 109 ve 218 μM dozları, LH'in varlığında ve yokluğunda luteal hücre kültüründe 24 saatlik süreyle inkübe edilmiş ve en yüksek dozun progesteron sentezini %45'e varan oranda düşürdüğü gösterilmiştir. Aynı çalışmada hücre kültürü ortamına, 1 veya 10 ng/ml LH ilave edildiğinde, beklenildiği üzere kontrol hücreleri tarafından sentezlenen progesteron miktarında çok fazla artış meydana gelmiştir. Fakat LH ilavesinin, metal uygulanmış grupta progesteron sentezinde beklenen artışı göstermediği ve LH'in etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar bu etkinin kalsiyum-kadmiyum rekabetine bağlı olabileceğini ifade etmişlerdir. Mevcut çalışmada ise, söz konusu araştırmada kullanılan dozlardan çok daha düşük dozlarda bile benzer etki gözlenmiştir. Bu

farklılığın oluşmasında birkaç nedenin etkili olabileceği düşünülmektedir. Bunlardan ilki, mevcut çalışmada hücre kaynağı olarak farklı bir hayvan türü kullanılmıştır. İkinci olarak, çalışmada kullanılan doku gebe olmayan hayvanlardan alınmıştır. Muhtemel üçüncü neden ise hücrelerin metale maruz kalma süresidir. Mevcut çalışmada hücreler iki periyotta gerçekleşmek üzere toplamda 96 saat süreyle kadmiyuma maruz kalmışlardır. Bu üç nedenin, çalışmalar arasında uygulanan doz farklılığında etkili olabileceği tahmin edilmektedir.

Kadmiyumun granuloza hücre kültüründe steroid sentezine etkisinin araştırıldığı sınırlı sayıda çalışma vardır. Bu çalışmaların birinde kadmiyum klorürün 27, 54, 109, 218 μM dozları, rat granuloza hücre kültüründe 48 saat süreyle inkübe edilmiş ve üretilen progesteron miktarının en yüksek dozda %80 oranında azaldığı ortaya konmuştur (Paksy ve ark. 1992). Benzer bir çalışmada kadmiyum klorürün 8, 16, 32, 64 μM dozları kullanılarak insan granuloza hücre kültüründe gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada da inkübasyon 48 saat süreyle gerçekleştirilmiş ve inkübasyon sonucu üretilen progesteron miktarının, en yüksek dozda %65 oranında azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, kadmiyumun yüksek dozlarının hücre morfolojisinde önemli değişiklikler meydana getirdiği belirtilmiştir. Araştırmacılar kadmiyumun granuloza hücreleri tarafından sentezlenen progesteron miktarını azaltıcı etkisinin, kalsiyum-kalmodulin sistemini bozması ve hücrede morfolojik olarak dejenerasyon meydana getirmesinden kaynaklanabileceğini ifade etmişlerdir. Ratlar üzerinde gerçekleştirilen benzer bir in vitro çalışmada ise, kadmiyum klorürün 10, 20, 40 μM dozlarının granuloza hücre kültüründe uygulanması sonucu üretilen progesteron miktarının en yüksek dozda %60'a varan oranda azaldığı gösterilmiştir. Anılan çalışmada kadmiyumun in vivo etkisine de bakılmış ve 2,5; 5; 7,5 mg/kg dozları, subkutan olarak östrüs siklusu boyunca ratlara enjekte edilmiş ve sonrasında yapılan hormon analizlerinde, uygulanan bütün dozların benzer etki göstererek serum progesteron seviyesini yaklaşık %50 oranında azalttığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada, hem in vivo hem de in vitro kadmiyum uygulamasının StAR ekspresyonunu azalttığı da gösterilmiştir. Araştırmacılar kadmiyumun progesteron sentezini azaltıcı etkisinin, StAR ekspresyonu üzerine olan olumsuz etkisinden kaynaklanabileceğini vurgulamışlardır (Zhang ve Jia 2007). Yukarıda sıralanan üç

çalışmada da, kadmiyumun artan dozlarının granuloza hücreleri tarafından sentezlenen progesteron miktarını önemli oranda azalttığı gösterilmiştir. Bu çalışmalar, çalışmamızdan hücre çeşidi, hücrelerin elde edildiği tür ve hücrelerin kadmiyuma maruz kalma süresi açısından farklılıklar arz etmekle birlikte, steroid sentez mekanizması açısından mevcut çalışmayı destekler niteliktedir. Çalışmamızda uygulanan en yüksek dozun 1 µM olduğu düşünüldüğünde, kullanılan kadmiyum miktarının bu çalışmalara kıyasla daha düşük olduğu görülmektedir. Bu açıdan mevcut çalışma, çok daha düşük kadmiyum dozlarının steroid sentezinin etkileyebileceğini göstermektedir.

Plasenta, progesteron sentezinde korpus luteumdan sonra önemli bir konuma sahiptir. Plasentanın büyük bir kısmını trofoblast hücreler oluşturmaktadır. Bu hücreler progesteron sentezlemektedirler. Rapor edilen çalışmaların birinde, insan trofoblast hücre kültüründe kadmiyum klorürün 5, 10 ve 20 µM dozlarının progesteron sentezine etkisi ve hücrelerde birikimi araştırılmıştır. Söz konusu çalışmada kadmiyumun progesteron sentezini %60'a varan oranda düşürdüğü tespit edilmiş ve ayrıca hücrelerde çok önemli olmasada, bir miktar kadmiyum birikimi gözlenmiştir. Anılan çalışmanın metod kısmı mevcut çalışmaya benzemekte olup iki farklı periyotta gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin yapışması için yapılan iki günlük inkübasyondan sonra hücreler, 48-72 saat ve 72-96 saat aralıklarında kadmiyuma maruz bırakılmıştır. Maruziyet sonrası yapılan hormon analizlerinde ortaya çıkan sonuçlar mevcut çalışmanın bulgularını destekler niteliktedir. Kadmiyum ilaveli ikinci inkübasyonun, yani 72-96 saat arasında gerçekleştirilen inkübasyon periyodundaki maruziyetin, progesteron sentezini daha fazla düşürdüğü gözlenmiştir (Jolibois ve ark. 1999). Söz konusu çalışma, çalışmamızın sonuçlarında gözlendiği gibi, hem kadmiyumun steroid sentezini etkilediğinin gösterilmesi hem de hücrelerin iki periyotta kadmiyuma maruz bırakıldığında, ikinci periyotta etkinin daha fazla olduğunu göstermesi açısından önemlidir. Çalışmamıza kıyasla anılan araştırmada, çok daha yüksek dozlarda kadmiyum kullanılmıştır. Bu farklılığın oluşumunda, kullanılan tür ve hücre çeşidi farklılığının etkili olabileceği düşünülmektedir.

Mevcut çalışmada kurşun asetatın luteal progesteron sentezini önemli derecede baskıladığı bulunmuştur. Rapor edilen çalışmalarda, kurşunun luteal progesteron sentezine etkisinin araştırıldığı çalışmaya rastlanılmamıştır. Kurşunun insan granuloza hücre kültüründe progesteron sentezi üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada (Paksy ve ark. 2001), kurşun asetatın 800 ve 1600 µM dozları, hücrelerle 48 saat süreyle inkübe edildiğinde, progesteron sentezini %40-80 oranlarında düşürürken, kurşunun uygulanan 100, 200 ve 400 µM dozlarının progesteron sentezinde önemli bir değişiklik meydana getirmediği belirtilmiştir. Aynı çalışmada ayrıca kurşunun insan ovaryumu foliküler sıvısında biriktiği ve yüksek kadmiyum dozlarının hücre morfolojisinde değişiklik meydana getirdiği gösterilmiştir. Söz konusu araştırmada, mevcut çalışmaya kıyasla etki elde edilen dozların çok daha yüksek olmasında, mevcut çalışmadan farklı bir hücre kaynağı ve hücre çeşidi çalışılmış olması ve ayrıca hücrelerin kurşuna maruziyet süresinin daha kısa olmasının etkili olabileceği düşünülmektedir. Anılan çalışmada, steroidojenik aktivite açısından kurşunun progesteron sentezini düşürücü etki göstermesi, çalışmamızın sonucunu teyit eder mahiyettedir. Çalışmamızda, anılan çalışmaya kıyasla kullanılan dozların çok daha düşük olması, düşük dozlarda bile kurşunun progesteron sentezini etkilediğinin gösterilmesi açısından ayrıca önem arz etmektedir.

Yapılan bir in vivo çalışmada, ratlar üç farklı gruba ayrılarak içme sularına 20 ppm kurşun klorür katılmış ve sonrasında ovaryumlarındaki progesteron miktarı ölçülmüştür. İlk grupta, anne rat gebe kaldıktan sonra 19 ila 21 gün yavrusu doğuncaya kadar kurşuna maruz bırakılmış ve sonra doğan yavrusunun ovaryumları analiz için kullanılmıştır. İkinci grupta, anne rat gebeliğin 8. gününden doğum sonrası yavrunun sütten kesileceği 21. güne kadar kurşuna maruz bırakılmış ve yavrunun ovaryumları analiz için kullanılmıştır. Üçüncü grupta ise, anne rat gebeliğin 8. gününden doğum sonrası yavrunun sütten kesileceği 21. güne kadar ve sonrasında yavru 150 günlük yaşa gelinceye kadar kurşuna maruz bırakılmış ve analiz için ovaryumları kullanılmıştır. İlk iki uygulama grubunda, kontrole oranla ovaryum progesteron miktarında azalma gözlenirken, üçüncü grupta önemli bir fark kaydedilmemiştir (Wiebe ve ark. 1988). Başka bir in vivo çalışmada gebelik ve

laktasyon boyunca anne ratlara kurşun asetat solüsyonu (12 mg/ml) günlük 1 ml içirilmiştir. Maruziyet sonrasında yapılan analizlerde yavruların serum östrojen, LH ve IGF-I seviyelerinin azaldığı belirtilmiştir (Dearth ve ark. 2002). Benzer diğer bir in vivo çalışmada ise gebelik ve laktasyon boyunca günde 1 ml içirilen kurşun asetat solüsyonunun (12 mg/ml), hem serum östrojen seviyesini hem de steroid sentezinde görevi olan StAR ekspresyonunu azalttığı belirtilmiştir (Srivastava ve ark. 2004). Bu üç çalışmada da, kurşuna gebelikte ve laktasyon döneminde maruziyet sonucu, steroid hormonlar olan progesteron ve östrojen miktarının azaldığının gösterilmesi ve Srivastava ve ark. (2004) tarafından StAR ekspresyonunun azaldığının belirtilmesi, kurşunun steroid sentez mekanizmasını etkileyerek steroid sentezini azalttığını göstermektedir. Bu çalışmalar in vivo olmasıyla birlikte, kurşunun steroid sentezini olumsuz yönde etkilediğinin göstergesi olması itibariyle çalışmamızın sonuçlarını desteklemektedir.

Mevcut çalışmada cıva klorürün 1; 2,5; 5, 10 μ M dozlarda kullanılması sonucu, özellikle 5 günlük inkübasyon sonrasında, üretilen progesteron miktarında %54'a varan oranda düşüş gözlenmiştir. Yapılan literatür taramalarında, luteal hücre kültüründe cıvanın progesteron sentezi üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya ulaşılamamıştır. Mevcut araştırmanın konusuyla yakın ilişkide olabilecek bir çalışmada, domuz granuloza hücre hücre kültüründe progesteron sentezi araştırılmıştır. Fakat anılan çalışmada bizim kullandığımız dozlardan çok daha yüksek miktarlarda cıva klorür kullanılmıştır. Söz konusu çalışmada, gebe domuz granuloza hücreleri cıva klorürün 185, 260, 485 ve 922 μ M dozlarına 18 saat süreyle maruz bırakılmış ve sonrasında hücre ortamı toplanıp hormon analizleri sonucunda kontrol grubuna kıyasla bütün dozlarda sentezlenen progesteron miktarında önemli derecede azalma saptanmıştır (Roychoudhury ve ark. 2015). Bir başka in vitro çalışmada, cıvanın insan adrenokarsinom hücre hattında steroid sentezine etkisini araştırmak amacıyla hücreler, cıva klorürün 1, 5, 25, 50 ve 100 μ M dozlarına 24 saat süreyle maruz bırakılmış ve sonrasında hücre ortamı toplanıp hormon analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda, cıvanın progesteron sentezini 25 μ M dozda %90 oranında düşürdüğü, 50 ve 100 μ M dozlarda ise hemen hemen durdurduğu gösterilmiştir (Knazicka ve ark. 2013). Bahsedilen iki çalışmada kullanılan hücre,

hücre kaynağı ve hücrelerin cıvaya maruziyet süresi çalışmamıza göre farklılıklar arz etmektedir. Çalışmamıza kıyasla, söz konusu araştırmalarda kullanılan dozların daha yüksek olmasında, bu farklılıkların etkili olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte söz konusu çalışmalarda, çalışmamızda gözleendiği gibi cıvanın steroid sentezini azaltıcı etkisinin ortaya konması, mevcut çalışmayı destekleyici mahiyette olduğu için önemli görülmüştür. Çalışmamızda cıvanın, çok düşük dozlarda bile progesteron sentezini azalttığına gösterilmiş olması da, çalışmanın sonucunu ayrıca önemli kılmaktadır.

Cıvanın üreme üzerine etkisinin araştırıldığı in vivo bir çalışmada, hamsterlara östrüs siklusu günlerinde 1 mg/ml cıva klorür periton içi enjekte edilmiş ve yapılan analizlerde hem plazmada hem de luteal dokuda progesteron miktarının azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada ovaryumda foliküler gelişimin yavaşladığı ve korpus luteum oluşumunun uzadığı belirtilmiştir (Lamperti ve Printz 1973). Söz konusu çalışma in vivo olarak gerçekleştirilmiş olmakla birlikte, cıvanın progesteron sentezini ve luteal doku oluşumunu etkilediğini göstermesi açısından çalışmamızı destekler mahiyettedir.

Sonuç olarak mevcut çalışma, ovaryum steroidogenesizi üzerine kadmiyum, kurşun ve cıvanın etkisinin araştırıldığı ender çalışmalardandır. Çalışma ayrıca, inek luteal hücre kültüründe kadmiyum, kurşun ve cıvanın progesteron sentezine etkisinin araştırıldığı ilk çalışma olması yönüyle de önem arz etmektedir. Mevcut araştırmada, rapor edilen çalışmalara oranla çok daha düşük miktarlarda ağır metal kullanıldı ve bu miktarların bile luteal progesteron sentezini önemli derecede düşürdüğü gösterildi. Bu sonuçlar kadmiyum, kurşun ve cıvanın üreme sağlığı üzerine olumsuz etkilerinin olduğuna dair yapılan çalışmaları desteklemekle birlikte, luteal hücrelerin fonksiyonuna bu derece etki ettiğini göstermesiyle, muhtemel üreme problemlerinin kaynağına da ışık tutmaktadır. Son olarak, ağır metallerin sağlık üzerine mutlak manada zararlı etkileri olduğuna dair yapılan çalışmaları destekleyici mahiyette bir veri elde edilmiştir. Bu yönüyle mevcut çalışmanın, ağır metal kullanımı ve yönetimine dair yapılacak çeşitli yasal düzenlemelerde ilave bir kaynak olarak değerlendirileceğine inanılmaktadır.

KAYNAKLAR

- ADAMS GP, JAISWAL R, SINGH J, MALHI P (2008). Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*, 69(1): 72-80.
- ALAÇAM E (2007). Evcil hayvanlarda doğum ve infertilite. 6. Baskı, Medisan Yayınevi, Ankara.
- ALBERING HJ, VAN LEUSEN SM, MOONEN EJ, HOOGEWERFF JA, KLEİNJANS JC (1999). Human health risk assessment: A case study involving heavy metal soil contamination after the flooding of the river Meuse during the winter of 1993-1994. *Environmental health perspectives*, 107(1): 37-43.
- ARIKAN Ş, RODWAY RG (2000). Effect of cyclodextrin-encapsulated β -carotene on progesterone production by bovine luteal cells. *Animal reproduction science*, 64(3); 149-160.
- ATSDR (2013). Cadmium Toxicity. Agency for Toxic Substances and Disease Registry Case Studies in Environmental Medicine (CSEM), USA.
- BAKER EL, FELDMAN RG, WHITE RA, HARLEY JP, NILES CA, DINSE GE, BERKEY CS (1984). Occupational lead neurotoxicity: a behavioural and electrophysiological evaluation. Study design and year one results. *British Journal of Industrial Medicine*, 41(3): 352-361.
- BAYEN S, KOROLEVA E, LEE HK, OBBARD JP (2005). Persistent organic pollutants and heavy metals in typical seafoods consumed in Singapore. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 68(3), 151-166.
- BELLINGER DC (2005). Teratogen update: lead and pregnancy. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 73(6): 409-420.
- BRADL HB (2005). Heavy metals in the environment: origin, interaction and remediation: origin, interaction and remediation. Ed. HB BRADL, (Vol. 6). Academic Press. p:98-124.
- BRAW-TAL R, YOSSEFI S (1997). Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *Journal of reproduction and fertility*, 109(1): 165-171.

- BROCKHAUS A, FREIER I, EWERS U, JERMANN E, DOLGNER R (1983). Levels of cadmium and lead in blood in relation to smoking, sex, occupation, and other factors in an adult population of the FRG. *International archives of occupational and environmental health*, 52(2): 167-175.
- CLARKSON TW, MAGOS L (2006). The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Critical reviews in toxicology*, 36(8): 609-662.
- COBBETT C, GOLDSBROUGH P (2002). Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual review of plant biology*, 53(1): 159-182.
- COOK B, KALTENBACH CC, NORTON HW, NALBANDOV AV (1967). Synthesis of Progesterone in Vitro by Porcine Corpora Lutea 1. *Endocrinology*, 81(3): 573-584.
- CROCETTI AF, MUSHAK P, SCHWARTZ J (1990). Determination of numbers of lead-exposed women of childbearing age and pregnant women: an integrated summary of a report to the US Congress on childhood lead poisoning. *Environmental health perspectives*, 89: 121-124
- DAVIDSON, PW, MYERS GJ, WEISS B (2004). Mercury exposure and child development outcomes. *Pediatrics*, 113(3):1023-1029.
- DAVIS BJ, PRICE HC, O'CONNOR RW, FERNANDO R, ROWLAND AS, MORGAN DL (2001). Mercury vapor and female reproductive toxicity. *Toxicological Sciences*, 59(2): 291-296.
- DAVIS LE, WANDS JR, WEISS SA, PRICE DL, GIRLING EF (1974). Central nervous system intoxication from mercurous chloride laxatives: quantitative, histochemical, and ultrastructural studies. *Archives of neurology*, 30(6): 428-431.
- DEARTH RK, HINEY JK, SRIVASTAVA V, BURDICK SB, BRATTON GR, LES DEES W (2002). Effects of lead (Pb) exposure during gestation and lactation on female pubertal development in the rat. *Reproductive Toxicology*, 16(4): 343-352.
- DEMAYO A, TAYLOR MC, TAYLOR KW, HODSON PV, HAMMOND PB (1982). Toxic effects of lead and lead compounds on human health, aquatic life, wildlife plants, and livestock. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 12(4): 257-305.
- EFSA (2009). Cadmium in food. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. European Food Safety Authority, *The EFSA Journal*, 980: 1-139

- EISENMANN CJ, MILLER RK (1994). The placental transfer and toxicity of selenite relative to cadmium in the human term perfused placenta. *Placenta*, 15(8): 883-895.
- EKINO S, SUSAKI M, NINOMIYA T, IMAMURA K, KITAMURA T (2007). Minamata disease revisited: an update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning. *Journal of the neurological sciences*, 262(1): 131-144.
- ELINDER CG, KJELLSTROM T, FRIBERG L, LINNMAN BLL (1976). Cadmium in kidney cortex, liver, and pancreas from Swedish autopsies. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 31(6): 292-302.
- ELINDER CG, KJELLSTROM T, LIND B, LINNMAN L, PISCATOR M, SUNDSTEDT K (1983). Cadmium exposure from smoking cigarettes: variations with time and country where purchased. *Environmental research*, 32(1): 220-227.
- ELINDER CG, EDLING C, LINDBERG E, KÅGEDAL B, VESTERBERG O (1985). Assessment of renal function in workers previously exposed to cadmium. *British journal of industrial medicine*, 42(11): 754-760.
- EPA (2009). National Primary Drinking Water Regulations. Environmental Protection Agency, USA.
- ERIC PW, HERAHEL R, FEVIN TS (2013). Vander's Human Physiology: The Mechanism of Body Function. *Vander İnsan Fizyolojisi*. Çeviren: ÖZGÜNEN T, Güneş Tıp Kitabevleri Ltd. Sti., İstanbul, s: 622-632.
- ERICKSON HH, GOFF JP, UEMURA EE (2004). *Dukes' physiology of domestic animals*. (Ed.). W. O. Reece, John Wiley Sons, s: 693-715.
- ERNST E, CHRISTENSEN MK, POULSEN EH (1993). Mercury in the rat hypothalamic arcuate nucleus and median eminence after mercury vapor exposure. *Experimental and molecular pathology*, 58(3): 205-214.
- GALAŻYN-SIDORCZUK M, BRZÓSKA MM, MONIUSZKO-JAKONIUK J (2008). Estimation of Polish cigarettes contamination with cadmium and lead, and exposure to these metals via smoking. *Environmental monitoring and assessment*, 137(1-3):481-493.
- GARCIA-MORALES P, SACEDA M, KENNEY N, KIM N, SALOMON DS, GOTTARDIS MM, MARTIN, MB (1994). Effect of cadmium on estrogen receptor levels and estrogen-induced responses in human breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 269(24): 16896-16901.

- GILFILLAN SC (1965). Lead poisoning and the fall of Rome. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 7(2): 53-60.
- GOERING PL, WAALKES MP, KLAASSEN CD (1995). Toxicology of cadmium. In *Toxicology of metals* (p. 189-214). Springer Berlin Heidelberg.
- GRAHAM JD, CLARKE CL (1997). Physiological Action of Progesterone in Target Tissues 1. *Endocrine reviews*, 18(4): 502-519.
- HANUKOGLU I (1992). Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 43(8): 779-804.
- HOPKINS SM (1989). *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. Ed. McDonald LE, London, Lea and Febiger, p: 402.
- HUSEMAN CA, VARMA MM, ANGLE CR (1992). Neuroendocrine effects of toxic and low blood lead levels in children. *Pediatrics*, 90(2): 186-189.
- IARC (2006). *Summaries & evaluations: Inorganic and organic lead compounds. Vol 87, International Agency for Research on Cancer, Monographs for the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, Lyon.
- IHAVICOLI I, CARELLI G, STANEK EJ, CASTELLINO N, LI Z, CALABRESE EJ (2006). Low doses of dietary lead are associated with a profound reduction in the time to the onset of puberty in female mice. *Reproductive Toxicology*, 22(4): 586-590.
- IHAVICOLI I, FONTANA L, BERGAMASCHI A (2009). The effects of metals as endocrine disruptors. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 12(3): 206-223.
- IPCS (1990). *Methylmercury*. World Health Organization, International Programme on Chemical Safety, Environmental Health Criteria 101, Geneva.
- IPCS (1995). *Inorganic lead*. World Health Organization, International Programme on Chemical Safety, Environmental Health Criteria 165, Geneva.
- IRELAND JJ, MURPHEE RL, COULSON PB (1980). Accuracy of predicting stages of bovine estrous cycle by gross appearance of the corpus luteum. *Journal of Dairy Science*, 63(1); 155-160.

- JÄRUP L, BERGLUND M, ELINDER CG, NORDBERG G, VANTER M (1998). Health effects of cadmium exposure—a review of the literature and a risk estimate. *Scandinavian journal of work, environment & health*, 1-51.
- JÄRUP L (2003). Hazards of heavy metal contamination. *British medical bulletin*, 68(1): 167-182.
- JOLIBOIS LS, SHI W, GEORGE WJ, HENSON MC, ANDERSON MB (1999). Cadmium accumulation and effects on progesterone release by cultured human trophoblast cells. *Reproductive Toxicology*, 13(3): 215-221.
- JUNAID M, CHOWDHURI DK, NARAYAN R, SHANKER R, SAXENA DK (1997). Lead-induced changes in ovarian follicular development and maturation in mice. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 50(1): 31-40.
- KÄGI JH (1991). Overview of metallothionein. *Methods in enzymology*, 205: 613-626.
- KNAZICKA Z, LUKAC N, FORGACS Z, TVRDA E, LUKACOVA J, SLIVKOVA J, MASSANYI P (2013). Effects of mercury on the steroidogenesis of human adrenocarcinoma (NCI-H295R) cell line. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 48(3): 348-353.
- KOMÁREK M, ETTLER V, CHRASTNÝ V, MIHALJEVIČ M (2008). Lead isotopes in environmental sciences: a review. *Environment International*, 34(4): 562-577.
- KOSTA L, BYRNE AR, ZELENKO V (1975). Correlation between selenium and mercury in man following exposure to inorganic mercury. *Nature*, 254: 238 – 239
- KRISHNAN SS, LUI SMW, JERVIS RE, HARRISON JE (1990). Studies of cadmium uptake in bone and its environmental distribution. *Biological trace element research*, 26(1): 257-261.
- LAMPERTI A, PRINTZ RH (1973). Effects of mercuric chloride on the reproductive cycle of the female hamster. *Biology of reproduction*, 8(3): 378-387.
- LAMPERTI AA, PRINTZ RH (1974). Localization, accumulation, and toxic effects of mercuric chloride on the reproductive axis of the female hamster. *Biology of reproduction*, 11(2): 180-186.

- LAMPERTI A, NIEWENHUIS R (1976). The effects of mercury on the structure and function of the hypothalamo-pituitary axis in the hamster. *Cell and tissue research*, 170(3): 315-324.
- LEONI G, BOGLIOLO L, DEIANA G, BERLINGUER F, ROSATI I, PINTUS PP, NAITANA S (2002). Influence of cadmium exposure on in vitro ovine gamete dysfunction. *Reproductive toxicology*, 16(4): 371-377.
- LIENESCH LA, DUMONT JN, BANTLE JA (2000). The effect of cadmium on oogenesis in *Xenopus laevis*. *Chemosphere*, 41(10): 1651-1658.
- LIN D, SUGAWARA T, STRAUSS JF, CLARK BJ, STOCCO DM, SAENGER P, MILLER WL (1995). Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science*, 267(5205): 1828-1831.
- LIN FJ, FITZPATRICK JW, IANNOTTI CA, MARTIN DS, MARIANI BD, TUAN RS (1997). Effects of cadmium on trophoblast calcium transport. *Placenta*, 18(4): 341-356.
- LUSSIER JG, MATTON P, DUFOUR JJ (1987). Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *Journal of Reproduction and Fertility*, 81(2): 301-307.
- MARIEB EN (2005). *Anatomy & Physiology. Second Edition*. Ed. MARIEB EN Pearson Education. San Francisco, p:922
- MASSANYI P, LUKÁČ N, UHRIN V, TOMAN R, PIVKO J, RAFAY J, SOMOSY Z (2007). Female reproductive toxicology of cadmium. *Acta Biologica Hungarica*, 58(3): 287-299.
- MCCRACKEN JA, CUSTER EE, LAMSA JC (1999). Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiological reviews*, 79(2): 263-323.
- MILVAE RA, HINCKLEY ST, CARLSON JC (1996). Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. *Theriogenology*, 45(7): 1327-1349.
- NAMPOOTHIRI LP, GUPTA S (2006). Simultaneous effect of lead and cadmium on granulosa cells: a cellular model for ovarian toxicity. *Reproductive Toxicology*, 21(2):179-185.

- NILSSON U, SCHUTZ A, SKERFVING S, MATTSSON S (1995). Cadmium in kidneys in Swedes measured in vivo using X-ray fluorescence analysis. *International archives of occupational and environmental health*, 67(6): 405-411.
- NISHIJO M, NAKAGAWA H, HONDA R, TANEBE K, SAITO S, TERANISHI H, TAWARA K (2002). Effects of maternal exposure to cadmium on pregnancy outcome and breast milk. *Occupational and environmental medicine*, 59(6): 394-397.
- NISWENDER GD, JUENGEL JL, SILVA PJ, ROLLYSON MK, MCINTUSH EW (2000). Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological reviews*, 80(1): 1-29.
- NISWENDER GD (2002). Molecular control of luteal secretion of progesterone. *Reproduction*, 123(3): 333-339.
- OGOSHI K, MORIYAMA T, NANZAI Y (1989). Decrease in the mechanical strength of bones of rats administered cadmium. *Archives of toxicology*, 63(4): 320-324.
- PAKSY K, VARGA B, LÁZÁR P (1992). Cadmium interferes with steroid biosynthesis in rat granulosa and luteal cells in vitro. *Biometals*, 5(4): 245-250.
- PAKSY K, RAJCZY K, FORGÁCS Z, LÁZÁR P, BERNARD A, GÁTI I, KAÁLI GS (1997). Effect of cadmium on morphology and steroidogenesis of cultured human ovarian granulosa cells. *Journal of Applied Toxicology*, 17(5): 321-327.
- PAKSY K, GÁTI I, NÁRAY M, RAJCZY K (2001). Lead accumulation in human ovarian follicular fluid, and in vitro effect of lead on progesterone production by cultured human ovarian granulosa cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 62(5): 359-366.
- PAPADOPOULOS V, BROWN AS (1995). Role of the peripheral-type benzodiazepine receptor and the polypeptide diazepam binding inhibitor in steroidogenesis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 53(1): 103-110.
- PATRA RC, SWARUP D, KUMAR P, NANDI D, NARESH R, ALI SL (2008). Milk trace elements in lactating cows environmentally exposed to higher level of lead and cadmium around different industrial units. *Science of the total environment*, 404(1): 36-43.
- PETERS H (1970). Migration of gonocytes into the mammalian gonad and their differentiation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*: 91-101.

- PIASEK M, LASKEY JW (1994). Acute cadmium exposure and ovarian steroidogenesis in cycling and pregnant rats. *Reproductive Toxicology*, 8(6): 495-507.
- PILLAI A, PRIYA PL, GUPTA S (2002). Effects of combined exposure to lead and cadmium on pituitary membrane of female rats. *Archives of toxicology*, 76(12): 671-675.
- PILLAI A, PRIYA L, GUPTA S (2003). Effects of combined exposure to lead and cadmium on the hypothalamic-pituitary axis function in proestrous rats. *Food and chemical toxicology*, 41(3): 379-384.
- PINE MD, HINEY JK, DEARTH RK, BRATTON GR, LES DEES W (2006). IGF-1 administration to prepubertal female rats can overcome delayed puberty caused by maternal Pb exposure. *Reproductive toxicology*, 21(1): 104-109.
- PISCATOR M (1984). Long-term observations on tubular and glomerular function in cadmium-exposed persons. *Environmental health perspectives*, 54: 175-179.
- RABINOWITZ MB, WETHERILL GW, KOPPLE JD (1976). Kinetic analysis of lead metabolism in healthy humans. *Journal of Clinical Investigation*, 58(2): 260.
- RATHBONE MJ, KINDER JE, FIKE K, KOJIMA F, CLOPTON D, OGLE CR, BUNT CR (2001). Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. *Advanced drug delivery reviews*, 50(3): 277-320.
- REHM S, WAALKES MP (1988). Cadmium-induced ovarian toxicity in hamsters, mice, and rats. *Toxicological Sciences*, 10(4): 635-647.
- ROELS HA, LAUWERYS RR, BERNARD AM, BUCHET JP, VOS A, OVERSTEYNS M (1991). Assessment of the filtration reserve capacity of the kidney in workers exposed to cadmium. *British journal of industrial medicine*, 48(6): 365-374.
- RONIS MJJ, BADGER TM, SHEMA SJ, ROBERSON PK, SHAIKH F (1996). Reproductive toxicity and growth effects in rats exposed to lead at different periods during development. *Toxicology and applied pharmacology*, 136(2): 361-371.
- RONIS MJJ, BADGER TM, SHEMA SJ, ROBERSON PK, SHAIKH F (1998). Effects on pubertal growth and reproduction in rats exposed to lead perinatally or continuously throughout development. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 53(4): 327-341.

- ROWLAND AS, BAIRD DD, WEINBERG CR, SHORE DL, SHY CM, WILCOX AJ (1994). The effect of occupational exposure to mercury vapour on the fertility of female dental assistants. *Occupational and Environmental Medicine*, 51(1): 28-34.
- ROYCHOUDHURY S, MASSANYI P, SLIVKOVA J, FORMICKI G, LUKAC N, SLAMECKA J, KOLESAROVA A (2015). Effect of mercury on porcine ovarian granulosa cells in vitro. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 50(8): 839-845.
- SAKSENA SK, SALMONSEN R (1983). Effects of cadmium chloride on ovulation and on induction of sterility in the female golden hamster. *Biology of reproduction*, 29(1): 249-256.
- SATARUG S, MOORE MR (2004). Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. *Environmental health perspectives*, 112(10): 1099-1103
- SCHULTE-SCHREPPING KH, PISCATOR M (1985). Cadmium and cadmium compounds. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*.
- SCHUURS AHB (1999). Reproductive toxicity of occupational mercury. A review of the literature. *Journal of dentistry*, 27(4): 249-256.
- SCOULLOS MJ, VONKEMAN GH, THORNTON I, MAKUCH Z (2001). Mercury—Cadmium—Lead Handbook for Sustainable Heavy Metals Policy and Regulation. Ed. MJ SCOULLOS (Vol. 31). Springer Science & Business Media. s:11-289.
- SELEVAN SG, RICE DC, HOGAN KA, EULING SY, PFAHLES-HUTCHENS A, BETHEL J (2003). Blood lead concentration and delayed puberty in girls. *New England Journal of Medicine*, 348(16): 1527-1536.
- SMIDA AD, VALDERRAMA XP, AGOSTINI MC, FURLAN MA, CHEDRESE J (2004). Cadmium stimulates transcription of the cytochrome p450 side chain cleavage gene in genetically modified stable porcine granulosa cells. *Biology of reproduction*, 70(1): 25-31.
- SRIVASTAVA V, DEARTH RK, HINEY JK, RAMIREZ LM, BRATTON GR, LES DEES W (2004). The effects of low-level Pb on steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in the prepubertal rat ovary. *Toxicological Sciences*, 77(1): 35-40.

- STAYNER L, SMITH R, THUN M, SCHNORR T, LEMEN R (1992). A dose-response analysis and quantitative assessment of lung cancer risk and occupational cadmium exposure. *Annals of epidemiology*, 2(3): 177-194.
- STOCCO C, TELLERIA C, GIBORI G (2007). The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocrine reviews*, 28(1): 117-149.
- STUMPF TT, DAY ML, WOLFE MW, CLUTTER AC, STOTTS JA, WOLFE PL, KINDER JE (1989). Effect of estradiol on secretion of luteinizing hormone during the follicular phase of the bovine estrous cycle. *Biology of reproduction*, 41(1): 91-97.
- SUGITA M (1978). The biological half-time of heavy metals. *International archives of occupational and environmental health*, 41(1): 25-40.
- SUNDERLAND SJ, CROWE MA, BOLAND M P, ROCHE JF, IRELAND J J (1994). Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, 101(3): 547-555.
- SURKAN PJ, ZHANG A, TRACHTENBERG F, DANIEL DB, MCKINLAY S, BELLINGER DC (2007). Neuropsychological function in children with blood lead levels < 10µg/dL. *Neurotoxicology*, 28(6): 1170-1177.
- TAM PPL, LIU WK (1985). Gonadal development and fertility of mice treated prenatally with cadmium during the early organogenesis stages. *Teratology*, 32(3): 453-462.
- TAUPEAU C, POUPON J, NOMÉ F, LEFÈVRE B (2001). Lead accumulation in the mouse ovary after treatment-induced follicular atresia. *Reproductive toxicology*, 15(4): 385-391.
- TCHOUNWOU PB, YEDJOU CG, PATLOLLA AK, SUTTON DJ (2012). Heavy metal toxicity and the environment. In *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*, (p. 133-164). Springer Basel.
- TÉLLEZ-ROJO MM, BELLINGER DC, ARROYO-QUIROZ C, LAMADRID-FIGUEROA H, MERCADO-GARCIA, A, SCHNAAS-ARRIETA L, HU H. (2006). Longitudinal associations between blood lead concentrations lower than 10 µg/dL and neurobehavioral development in environmentally exposed children in Mexico City. *Pediatrics*, 118(2), e323-e330.
- THOMPSON J, BANNIGAN J (2008). Cadmium: toxic effects on the reproductive system and the embryo. *Reproductive Toxicology*, 25(3): 304-315.

- THUN MJ, SCHNORR TM, SMITH AB, HALPERIN WE, LEMEN RA (1985). Mortality among a cohort of US cadmium production workers—an update. *Journal of the National Cancer Institute*, 74(2): 325-333.
- TONG S, SCHIRNDING YEY, PRAPAMONTOL T (2000). Environmental lead exposure: a public health problem of global dimensions. *Bulletin of the World Health Organization*, 78(9): 1068-1077.
- TSURITANI I (1996). Ultrasonic assessment of calcaneus in inhabitants in a cadmium-polluted area. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 48(2): 131-140.
- UNEP (2008). Draft final review of scientific information on lead. United Nations Environment Programme, Chemicals Branch, Geneva.
- USGS (2008). Mineral Commodity Summaries, Cadmium. pp. 42–43. United States Geological Survey.
- USGS (2015). Mineral Commodity Summaries, Cadmium. pp. 36–37. United States Geological Survey.
- VARGA B, PAKSY K (1991). Toxic effects of cadmium on LHRH-induced LH release and ovulation in rats. *Reproductive Toxicology*, 5(3): 199-203.
- VARGA B, ZSOLNAI B, PAKSY K, NARAY M, UNGVÁRY GY (1993). Age dependent accumulation of cadmium in the human ovary. *Reproductive Toxicology*, 7(3): 225-228.
- WAALKES MP, REHM S (1992). Carcinogenicity of oral cadmium in the male Wistar (WF/NCr) rat: effect of chronic dietary zinc deficiency. *Toxicological Sciences*, 19(4): 512-520.
- WALTERS DL, SCHAMS D, SCHALLENBERGER E (1984). Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during the luteal phase of the oestrous cycle in the cow. *Journal of reproduction and fertility*, 71(2): 479-491.
- WANG LK, CHEN JP, HUNG YT, SHAMMAS NK (2009). Heavy metals in the environment. Eds. LK WANG, JP CHEN, YT HUNG, NK SHAMMAS CRC Press. p:14-20.

- WEST LA, HORVAT RD, ROESS DA, BARISAS BG, JUENGEL J L, NISWENDER GD (2001). Steroidogenic acute regulatory protein and peripheral-type benzodiazepine receptor associate at the mitochondrial membrane. *Endocrinology*, 142(1): 502-505.
- WHO (2007). Preventing Disease Through Healthy Environments, Exposure To Mercury: A Major Public Health Concern, Department of Public Health and Environment, World Health Organization, Geneva.
- WHO (2010). Preventing Disease Through Healthy Environments, Exposure To Lead: A Major Public Health Concern, Department of Public Health and Environment, World Health Organization, Geneva.
- WIDE M (1980). Interference of lead with implantation in the mouse: effect of exogenous oestradiol and progesterone. *Teratology*, 21(2): 187-191.
- WIEBE JP, BARR KJ (1988). Effect of prenatal and neonatal exposure to lead on the affinity and number of estradiol receptors in the uterus. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, 24(4): 451-460.
- WIEBE JP, BARR KJ, BUCKINGHAM KD (1988). Effect of prenatal and neonatal exposure to lead on gonadotropin receptors and steroidogenesis in rat ovaries. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, 24(4): 461-476.
- WU G, KANG H, ZHANG X, SHAO H, CHU L, RUAN C (2010). A critical review on the bio-removal of hazardous heavy metals from contaminated soils: issues, progress, environmental concerns and opportunities. *Journal of Hazardous Materials*, 174(1):1-8.
- YANG PM, CHIU SJ, LIN KA, LIN LY (2004). Effect of cadmium on cell cycle progression in Chinese hamster ovary cells. *Chemico-biological interactions*, 149(2): 125-136.
- YILMAZ B (1999). *Hormonlar ve Üreme Fizyolojisi*, A. Ü. Basımevi, Ankara, s: 419-425
- YIĞİT A, ARIKAN S (2001). Changes in the Size Distribution of Steroidogenic and Non-steroidogenic Bovine Luteal Cells During the Oestrus Cycle. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 25(4): 545-550.
- YU HS, TAM PPL, CHAN STH (1985). Effects of cadmium on preimplantation mouse embryos in vitro with special reference to their implantation capacity and subsequent development. *Teratology*, 32(3): 347-353.

ZHANG W, JIA H (2007). Effect and mechanism of cadmium on the progesterone synthesis of ovaries. *Toxicology*, 239(3): 204-212.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Fatih Sultan

Soyadı: BİLMEN

Doğum Yeri ve Tarihi: İstanbul-1987

Uyruğu: T.C.

Medeni Durumu: Evli

Adres: Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Yahşihan,
71451, KIRIKKALE.

Telefon: 0318 357 33 01

E-posta: fatihsultanbilmen@gmail.com, fatihsultanbilmen@kku.edu.tr

II- Eğitimi

Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi 2010

Yabancı Dili: İngilizce

III- Ünvanları

Veteriner Hekim, 2010

Öğretim Görevlisi, 2010

Araştırma Görevlisi, 2013

III- Mesleki Deneyimi

2010-2013 yıllarında, Kırıkkale Üniversitesi Delice Meslek Yüksek Okulu Laborant ve Veteriner Sağlık Programı'nda Öğretim Görevliliği

2013-2015 yıllarında, Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevliliği

IV- Bilimsel İlgi Alanları

Projeleri:

1. ARIKAN S, SIMSEK O, KALENDER H, ESSİZ D, ATMACA N, KABAKCI R, BILMEN FS. "İnsektisid, Fungusid ve Herbisidlerin Luteal Progesteron Sentezi Üzerine Etkilerinin In-Vitro Araştırılması" TÜBİTAK Projesi
2. SIMSEK O, ATMACA N, GUNER B, KABAKCI R, BILMEN FS. "Halep Keçilerinde bazı hematolojik ve biyokimyasal kan parametreleri" BAP Projesi
3. ARIKAN S, BILMEN FS. "İnek Luteal Hücre Kültüründe Sentezlenen Progesteron Seviyesi Üzerine Kadmiyum, Kurşun ve Cıvanın Etkilerinin Araştırılması" BAP Projesi
4. ERAT S, ARIKAN S, BILMEN FS, KABAKCI R. "Ankara Kedilerinin Çiftleşme Davranışlarının Araştırılması" BAP Projesi

Verdiği konferans ve seminerler:

1. Ağır Metallerin Dişi Üreme Sistemi Üzerine Etkisi

Katıldığı Kongre ve Sempozyumlar:

1. "Days Veterinary Medicine 2014" 5-7 Eylül 2014.
2. "New Insights to Experimental Cardiology: Adverse Remodelling, Stem Cells, Genetics" 17 Şubat 2015.

V- Yayınları

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. SIMSEK O, ATMACA N, GUNER B, KABAKCI R, BILMEN FS. Sağlıklı Halep keçilerinde bazı hematolojik ve biyokimyasal kan parametreleri. Türk Veteriner Hekimleri Birliği Dergisi, 1-2: 86-92, 2015.

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. ATMACA N, YILDIRIM E, GUNER B, KABAKCI R, BILMEN FS (2014). Effect of Resveratrol on Hematological and Biochemical Alterations in Rats Exposed to Fluoride. BioMed Research International, 2014, 698628, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/698628>.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

1. ATMACA N, CINAR M, GUNER B, KABAKCI R, BILMEN FS. Sıçanlarda Florid Toksikasyonu ile Olusan Hematolojik ve Biyokimyasal Degisiklikler Üzerine Resveratrolün Etkisi. 40. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2014.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

1. SIMSEK O, ATMACA N, GUNER B, KABAKCI R, BILMEN FS. Selected Hematological and Biochemical Parameters in Healthy Damascus Goats. Joint meeting of the FEPS and the Baltic Physiological Societies, Kaunas, Lithuania, 2015.
2. ARIKAN S, SIMSEK O, KALENDER H, ESSIZ D, ATMACA N, KABAKCI R, BILMEN FS. "Effects of Selected Insecticides on Progesterone Synthesis by Bovine Luteal Cells" 1st International Congress On Applied Biological Sciences, Macedonia. p: 37,2015