

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**ENDOMETRİYAL AĞIR METAL (KADMIYUM,
KURŞUN, CİVA VE ARSENİK) DÜZEYLERİNİN
AÇIKLANAMAYAN İNFERTİLİTE
ETYOLOJİSİNDEKİ ROLÜ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Emrullah TANRIKUT

**KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM
ANABİLİM DALI**

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Önder ÇELİK

MALATYA - 2011

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**ENDOMETRİYAL AĞIR METAL (KADMIYUM,
KURŞUN, CİVA VE ARSENİK) DÜZEYLERİNİN
AÇIKLANAMAYAN İNFERTİLİTE
ETYOLOJİSİNDEKİ ROLÜ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Emrullah TANRIKUT

**KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM
ANABİLİM DALI**

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Önder ÇELİK

MALATYA - 2011

**Bu tez, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
2011/52 proje numarası ile desteklenmiştir.**

TEŞEKKÜR

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Turgut Özal Tıp Merkezi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'ndaki uzmanlık eğitimim süresince bana her alanda destek olan, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım başta bölüm başkanımız ve tez danışmanım Prof. Dr. Önder ÇELİK' e,

Bu tezin hazırlanması aşamasında her konuda büyük bir özveri ve sabırla destek olan, fikir ve yardımlarını benden esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Abdullah KARAER' e,

Eğitimim sürecinde tüm bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan ve eğitimimde katkıda bulunan bölümümüzün diğer tüm öğretim üyelerine,

Numunelerin hazırlanmasında benden hiçbir yardımını esirgemeyen ve laboratuvarın tüm olanaklarından faydalanmamı sağlayan, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Moleküler Mikrobiyoloji Birimi Öğretim Üyesi Doç. Dr. Barış OTLU' ya,

Analizlerin yapılmasında sonsuz emekleri olan, İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi'nden Doç. Dr. Mehmet Ali AKSAN' a, Uz. Onur ÖZGÜL, Uz. Tuğba Raika KIRAN ve Uz. Ufuk Günay DOĞAN' a,

Tüm asistan arkadaşlarıma,

Tüm Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı bünyesinde çalışan hemşire, intörn dr. ve personellere,

Hastalarım,

Bütün ihtisas sürem boyunca beni manevi olarak destekleyen ve her koşulda yanımda yer alan sevgili eşim Songül TANRIKUT' a,

Yoğun çalışma temposu nedeniyle, ayırmam gereken zamanı ayıramadığım ve yeterince ilgilenemediğim biricik oğlum Mirza Eren' e

Sahip olduğum her şeyde payları olan ve yaşamımın her döneminde benden desteklerini esirgemeyip bu günlere gelmemi sağlayan sevgili ANNEM ve BABAM' a

SONSUZ TEŞEKKÜRLER...

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	iii
ŞEKİLLER, TABLOLAR VE RESİMLER DİZİNİ.....	V
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1.İnfertilite ve İnfertil Çiftin Değerlendirilmesi.....	4
2.2.Açıklanamayan İnfertilite.....	6
2.3.Fertilizasyon Süreci.....	7
2.4.İmplantasyon Süreci.....	9
2.5.Ağır Metaller ve Üreme Sağlığı Üzerine Etkileri.....	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1.Gereç.....	23
3.2.Yöntem.....	24
3.3.İstatistiksel Değerlendirme.....	32
4. BULGULAR.....	33
5. TARTIŞMA.....	36
5.1. Kadmiyum.....	36
5.2. Kurşun.....	44
5.3. Civa.....	46
5.4. Arsenik.....	47
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	49
7. ÖZET.....	50
8. SUMMARY.....	52
9. KAYNAKLAR.....	54

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A3	:Menstrüel Siklusun 3. Günü
As	:Arsenik
ABD	:Amerika Birleşik Devletleri
AMH	:Antimüllerian Hormon
ART	:Asiste Reprodüktif Teknikler
ATP	:Adenozintrifosfat
°C	:Santigrat Derece
Ca ²⁺	:Kalsiyum
Cd	:Kadmiyum
DNA	:Deoksiribonükleik Asit
DSÖ	:Dünya Sağlık Örgütü
E ₂	:Östradiol
ECM	:Ekstrasellüler Matriks
EGF	:Endotelial Büyüme Faktörü
ER	:Östrojen Reseptörü
FSH	:Folikül Stimüle Edici Hormon
g/mol	:Gram/Mol
HCl	:Hidroklorik Asit
Hg	:Civa
HNO ₃	:Nitrik Asit
HOXA	:Homeobox Gen
HSG	:Histerosalpingografi
ICSI	:İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
IGFBP-1	:İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Protein-1
IUI	:İntrauterin İnseminasyon
IVF	:İn-vitro Fertilizasyon
K ⁺	:Potasyum
kg/m ²	:Kilogram/Metrekare
LH	:Lüteinize Edici Hormon
LIF	:Lösemi İnhibitör Faktör
mA	:Miliamper

mg	:Miligram
ml	:Mililitre
ml/min	:Mililitre/Dakika
mRNA	:Messenger Ribonükleik Asit
μ g	:Mikrogram
μ l	:Mikrolitre
μ M	:Mikromol
MCP-1	:Monosit Kemotaktik Protein-1
MMP	:Matriks Metaloproteinaz
MUC1	:Musin-1
Na ⁺	:Sodyum
ng/dl	:Nanogram/Desilitre
nm	:Nanometre
Pb	:Kurşun
PDGF	:Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PRA	:Progesteron Reseptörü Tip A
PRB	:Progesteron Reseptörü Tip B
PTEN	:Fosfataz ve Tensin Homologları Geni
RIA	:Rahim İçi Araç
TGF	:Transforme Edici Büyüme Faktörü
TL	:Türk Lirası
TÖTM	:Turgut Özal Tıp Merkezi
TSH	:Tiroid Stimüle Edici Hormon
TvUSG	:Transvajinal Ultrasonografi
uPA	:Ürokinaz Plazminojen Aktivatör
VKİ	:Vücut Kitle İndeksi
ZP	:Zona Pellusida Proteini

ŞEKİLLER, TABLOLAR VE RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 2.1	:Dünya Sağlık Örgütü Semen Parametreleri	5
Şekil 2.1	:Sperm ve Oositin Füzyonu	8
Şekil 2.2	:Proliferatif ve Sekretuar Fazda Up veya Down Regüle Olan Faktörler	9
Şekil 2.3	:İmplantasyon Basamaklarında Etkili Moleküller	12
Şekil 2.4	:İnsan Embriyosunun Uterusa İmplantasyonu	16
Resim 3.1	:Perkin Elmer AAnalyst 800 Atomik Absorbsiyon Spektrometresi	25
Şekil 3.1	:Kadmiyum Kalibrasyon Grafiği	26
Şekil 3.2	:Kurşun Kalibrasyon Grafiği	27
Şekil 3.3	:Civa Kalibrasyon Grafiği	28
Şekil 3.4	:Arsenik Kalibrasyon Grafiği	29
Şekil 3.5	:Kadmiyum Analizine Ait Grafit Fırın Sıcaklık Programı	30
Şekil 3.6	:Kurşun Analizine Ait Grafit Fırın Sıcaklık Programı	30
Şekil 3.7	:Civa Analizine Ait Grafit Fırın Sıcaklık Programı	31
Şekil 3.8	:Arsenik Analizine Ait Grafit Fırın Sıcaklık Programı	31
Tablo 4.1	:Olguların Sosyodemografik Özellikleri	34
Tablo 4.2	:Analizi Yapılan Ağır Metalin Türü ve Olgu Sayıları	35
Tablo 4.3	:Kadmiyum ve Kurşun Düzeylerinin İki Grup Arasında Karşılaştırılması	35
Şekil 5.1	:E-Kadherin ile Kalsiyumun İlişkisi	42
Tablo 5.1	:Kadmiyumun Üreme Sağlığı Üzerine Olası Etkileri	43

1. GİRİŞ

Üreme çağındaki bir çiftin bir yıl boyunca korunmasız düzenli ilişkiye girmesine rağmen gebelik elde edememesi infertilite olarak tanımlanmaktadır ve üreme çağındaki çiftlerin yaklaşık %15'i infertilite problemi ile karşılaşmaktadır (1). İnfertilite nedeni araştırılırken çiftlerin yaklaşık %15-30'unda infertiliteyi açıklayacak bir neden bulunamamakta ve bu grup hastalar açıklanamayan infertil grup olarak adlandırılmaktadır (2). Astronot Carl Sagan'ın "absence of evidence is not evidence of absence" sözünde de belirttiği gibi herhangi bir nedenin bulunmaması nedenin olmadığı anlamına gelmemektedir.

İnfertilite tanısı konmuş ve Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) son verilerine göre semen analizi normal olan, erken foliküler fazda bazal hormon [Folikül Stimüle Edici Hormon (FSH), Lüteinleştirici Hormon (LH), Östradiol (E₂), Tiroid Stimüle Edici Hormon (TSH), Prolaktin] düzeyleri normal olan, tubal ve uterin anormalliği olmayan, ovulatuvar siklusları olduğu objektif olarak gösterilmiş olgular "açıklanamayan infertilite" olarak tanımlanır (3). Tedavi ile bu grupta gebelik oranlarının zamanlanmış cinsel ilişki ile % 5, ovulasyon indüksiyonu sonrası intrauterin inseminasyon (IUI) ile % 10 ve diğer asiste reproduktif teknikler (ART) ile % 15-25 arasında olduğu bildirilmektedir (4). Bu verilere bakıldığında tüm tedavi olanaklarının kullanılması sonrasında bile açıklanamayan infertilite olgularının yaklaşık % 70'inde tedavi ile gebelik elde edilemediği görülmektedir. Yapılan çalışmalarda yardımcı üreme tekniklerinin başarısını sınırlayan en önemli nedenlerden birinin implantasyon başarısızlığı olduğu gösterildiğinden (5); açıklanamayan infertilite vakalarında gebelik mahsulünün endometriyal kaviteye implantasyonuna ilişkin problemlerin rol oynayabileceği düşünülebilir.

İnfertilite üzerine yapılan pek çok çalışmada, spermin dışı genital yolundaki hareketi, ovumla birleşmesi ve embriyonun uterin kaviteye implantasyonu süreçlerinde birçok moleküler faktör ve mekanizmanın rol oynadığı gösterilmiştir. Bu süreçleri sekteye uğratabilecek faktörler de araştırmalarda önemli ilgi odağı olmuştur. Ağır metallerin bu süreçlerin herhangi birinde olumsuz rol oynayabileceği insan ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (6-10). Ancak, yaptığımız literatür taramasında açıklanamayan infertilite vakalarının endometriyum dokusundaki ağır metal seviyelerini konu alan çalışmaya rastlanmamıştır.

Ağır metallerin toplumsal yaşam alanlarına taşınmasının, dolayısıyla insan maruziyetinin en önemli nedeni endüstriyel atıklardır. Yirminci yüzyılda pek çok bilimsel gelişme yaşanmıştır. Bu gelişmelerin toplumsal yaşama en önemli yansıma biçimi ise sanayileşmede meydana gelen hızlı gelişmelerdir. Sanayileşmeye paralel olarak teknolojideki gelişmeler insan yaşamını kolaylaştırmış gibi görünüyorsa da, doğada yarattıkları tahribatın boyutları tahminlerin çok üzerindedir. 2003 yılı verilerine göre, çoğunluğu Çin ve Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) olmak üzere, sadece endüstri kuruluşlarındaki kömür yanması sonucu yaklaşık 413,7 milyon ton, Türkiye'de ise yaklaşık 15 milyon ton uçucu kül olarak ağır metaller açısından zengin tehlikeli atık oluşmaktadır (11). Ancak, küreselleşmeyle birlikte ülkeler ve toplumlar arasındaki mesafelerin ortadan kalkması nedeniyle bu kirlilik, sadece kirliliğe neden olan toplumları etkilemekle kalmamakta tüm dünyayı etkisi altına almaktadır. Diğer bir deyişle Çin, ABD ve benzeri gelişmiş ülkelerdeki sanayileşme kendi toplumlarının refah düzeyini yükseltip yaşam koşullarını kolaylaştırırken, neden olduğu doğa tahribatı ve çevresel kirliliğin insan sağlığı üzerine olumsuz etkileri ise kendilerinin yanı sıra yoksulluk ve açlıkla mücadele eden görece geri kalmış toplumları da ciddi manada etkilemektedir.

Günümüzde kâğıt sanayi, petrokimya, klor-alkali üretimi, gübre sanayi, demir-çelik sanayi, termik ve nükleer enerji üretimi gibi birçok endüstri kolunda farklı işlem kademelerinde biyosfere ağır metal atılımı gerçekleştiği bilinmektedir (12). Sanayileşme ile birlikte ağır metal içeren kömürlerin yakılmaya başlanması ile endüstri bölgelerindeki ağır metal kirliliği aşırı boyutlara ulaşmıştır.

Ağır metaller aslında yer kabuğunda doğal olarak bulunan bileşiklerdir. Ancak bunları insan sağlığı için tehlikeli kılan, gıdalar veya solunum yoluyla vücuda kolaylıkla alınabilme ve vücutta birikebilme özellikleridir. Kısa sürede yüksek seviyelerde maruziyet akut toksik tablolara neden olabilirken; uzun süreli düşük seviyelerde maruziyet ise birikebilme özellikleri nedeniyle çeşitli organlarda fonksiyon bozukluklarıyla sonuçlanabilir (13-16). Ağır metallerin üreme sağlığı üzerine etkilerine bakılacak olursa; kurşun (15, 7, 17), kadmiyum (8, 18), civa (9, 10), arsenik (19, 20), bakır (21) ve çinko (22) gibi farklı metallerin olumsuz etkileri olduğu farklı çalışmalarda gösterilmiştir.

Bu bilgiler ışığında endometriyumda kadmiyum, kurşun, civa ve arsenik gibi ağır metallerin bulunabileceğini ve bunların, transport sırasında sperm fonksiyonlarını veya implantasyon aşamasında blastokist ile endometrium arasındaki iletişimi bozarak açıklanamayan infertilite etyolojisinde rol oynayabileceği düşünülebilir.

Bu çalışmada “açıklanamayan infertilite” tanısı konulan kadın hastaların endometriyum dokusundaki kadmiyum, kurşun, civa ve arsenik seviyelerini saptamak ve bu seviyeleri aynı ağır metallerin kontrol grubundaki fertil kadınların endometriyum dokusundaki seviyeleri ile karşılaştırarak ağır metallerin açıklanamayan infertilite etyolojisinde olası rollerini araştırmak amaçlanmıştır.

Ocak 2011-Haziran 2011 arasında İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Turgut Özal Tıp Merkezi (TÖTM) Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite Polikliniği'ne başvuran ve yapılan incelemeler sonucunda “açıklanamayan infertilite” tanısı konulan, 18-40 yaşlarında, dismenore öyküsü olmayan, sigara veya alkol kullanmayan, son 3 ay içinde ovulasyon indüksiyonu, oral kontraseptif veya herhangi bir hormon ilacı kullanmayan, yaşamının herhangi bir döneminde rahim içi araç (RIA) kullanma öyküsü olmayan, metabolik hastalık, kalp damar hastalığı veya diyabet öyküsü olmayan, son 1 yıl içinde pelvik inflamatuvar hastalık geçirme öyküsü olmayan, vajinal muayenede enfeksiyon bulgusu olabilecek akıntısı olmayan ve kendisi veya partneri üreme sistemiyle ilgili herhangi bir ameliyat geçirmemiş (tubal pasaj değerlendirilmesi amacıyla yapılan laparoskopi hariç) kadın olgular çalışma kapsamına alındı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnfertilite ve İnfertil Çiftin Değerlendirilmesi

Uygun sıklıkta korunmasız ilişkiye rağmen bir yıl süreyle gebe kalamama durumu infertilite olarak tanımlanır (23). İnfertilite, daha önce hiç gebelik olmaması olarak tanımlanan primer infertilite ve en az bir gebelik sonrası gebe kalamama olarak tanımlanan sekonder infertilite olmak üzere iki gruba ayrılabilir.

İnfertil çiftin değerlendirilmesinde detaylı olarak alınan tıbbi, cerrahi ve jinekolojik öykü değerlendirmenin temelini oluşturur. Öyküye yaş ve mesleki kimyasal maruziyet açısından her iki çiftin meslekleri sorularak başlanmalıdır. Kadın partnerin öyküsü alınırken menstruel siklus, pelvik ağrı ve eğer varsa daha önceki gebelik sonuçları, infertilite için risk faktörü oluşturan daha önceden geçirilmiş pelvik inflamatuvar hastalık, RİA kullanımı ve pelvik cerrahi öyküsü detaylı olarak sorgulanmalıdır. Ayrıca infertilite ile yakından ilişkili olan endokrinolojik problemler açısından galaktore, hirsutizm ve kilo gibi sorular atlanılmamalıdır. Erkek partnerden de inmemiş testis, geçmişte genital cerrahi geçirip geçirmediği, genital travmaya maruz kalıp kalmadığı, enfeksiyon geçirip geçirmediği detaylı olarak sorgulanmalıdır. Daha sonra yapılacak fizik muayenede boy ve kilo ölçümleri yapılmalı, vucuttaki kıl dağılımı değerlendirilmeli ve pelvik muayene özenle yapılmalıdır.

İnfertil kadın hasta değerlendirilirken azalmış over rezervi, ovulatuvar disfonksiyon, tubal ve uterin faktör gibi patolojiler özellikle dikkate alınmalıdır. Öyküde adet düzensizliği, özellikle amenore veya oligomenore anovulasyonu gösterebileceği gibi bazal vucut sıcaklığı, siklusun 21. günü bakılan serum progesteron seviyesi, idrar LH seviyesi ve endometrial biyopsi ovulasyonun belirlenmesinde kullanılan temel parametrelerdir. Over rezervinin her infertil hastada değerlendirilmesi gerekmemektedir. Ancak 35 yaşın üstünde, geçirilmiş ovaryan cerrahi öyküsü olan, eksojen gonadotropin tedavisine kötü cevap veren ve yaştan bağımsız olarak, infertiliteye neden olabilecek bir patoloji tespit edilemeyen hastalarda over rezervi mutlaka değerlendirilmelidir (24). Bu amaçla, siklusun 3. günü (A3) FSH ve E₂ seviyesi ölçümü, transvajinal ultrasonografi (TvUSG) ile antral folikül sayımı, antimüllerian hormon (AMH) ve inhibin B düzeyleri ve klomifen sitrat challenge test yapılabilecek testlerdir (25).

Tubal faktörde temel problem, sperm ve oositin transportunda anatomik bir engelin olmasıdır. Tubal faktörü değerlendirmede, histerosalpingografi (HSG) ve laparoskopi en sık kullanılan iki yöntem olup altın standart laparoskopidir (26).

Fonksiyonel ve anatomik uterin bozuklukların gerek fertilitiyi, gerekse gebelik sonuçlarını olumsuz etkilediği bilinmektedir. Fertilitiyi etkileyebilecek, uterusu ait fonksiyonel veya anatomik bozuklukların değerlendirilmesi için HSG, TvUSG ve histeroskopi kullanılabilecek temel enstrümanlardır (27).

İnfertil çiftin değerlendirilmesinde erkek faktörü araştırılırken yapılacak ilk test semen analizidir. Standart semen analizi; ejakulatın hacim, renk ve koku gibi fiziksel özellikleri, pH, mililitredeki sperm konsantrasyonu, total sperm sayısı, hareketli spermelerin yüzdesi, sperm hareketi (hızlı, yavaş veya yerinde hareketli), beyaz küre konsantrasyonu ve morfolojiyi kapsar (28). Semen analizi 2-3 günlük cinsel perhizi takiben iki kez tekrar edilmelidir. DSÖ kriterlerine göre normal semen parametreleri Tablo 2.1’de özetlenmiştir.

Tablo 2.1: DSÖ Semen Parametreleri (29)

Parametre	Alt Referans Limiti
Semen volümü (ml)	1.5 (1.4 - 1.7)
Total sperm sayısı (10^6 / ejakulat)	39 (33 - 46)
Sperm konsantrasyonu (10^6 / ml)	15 (12 - 16)
Total motilite (PR + NP, %)	40 (38 - 42)
Progresif motilite (PR, %)	32 (31 - 34)
Vitalite (canlı spermatozoa, %)	58 (55 - 63)
Sperm morfoloji (normal form, %)	4 (3.0 - 4.0)
pH	≥ 7.2
Peroksidaz-pozitif lökositler (10^6 / ml)	< 1.0
MAR testi (bağlı partikülle birlikte olan motil spermatozoa, %)	< 50
Immunobead test (%)	< 50
Seminal çinko (μmol /ejakulat)	≥ 2.4
Seminal fruktoz (μmol /ejakulat)	≥ 13
Seminal nötral glukozidaz (mU/ejakulat)	≥ 20

PR: Progresif motilite, NP: Nonprogresif motilite

Tüm bu değerlendirmeler sonucunda infertilitenin etyolojisinde erkek faktörü %25, anovulasyon %27, tubal ve uterin anomaliler %22, diğer nedenler %9 oranında saptanırken, olguların yaklaşık %17'sinde herhangi bir etyolojik faktör bulunmamaktadır (30). Başka bir bakış açısıyla, yaklaşık her 6 infertil çiftten biri açıklanamayan infertilite olarak değerlendirilmektedir.

2.2. Açıklanamayan İnfertilite

2.2.1. Tanım: İnfertilite tanısı konmuş ve DSÖ'nün son verilerine göre semen analizi normal olan, erken foliküler fazda bazal hormon (FSH, LH, E₂, TSH, Prolaktin) düzeyleri normal olan, tubal ve uterin anormalliği olmayan, ovulatuvar siklusları olduğu objektif olarak gösterilmiş olgular "açıklanamayan infertilite" olarak tanımlanır (3).

2.2.2. Etiyoloji: Açıklanamayan infertilitenin olası nedenleri arasında;

- İmmünolojik nedenler (veriler çelişkili de olsa, bazı çalışmalarda artmış periferel natural killer hücrelerinin sayısı ile gebelik oranlarında azalma olduğu gösterilmiş),
- Hafif tubal hastalık,
- İleri kadın yaşı ve
- Endometriyozis suçlanmıştır (31).

Bununla birlikte, açıklanamayan infertilite genetik ve üreme fizyolojisiyle ilgili olası birçok nedenin yer aldığı heterojen bir kavram olarak değerlendirilmektedir (2).

2.2.3. Yönetim: Etiyolojideki belirsizlik bu hasta grubu için en akılcı tedavi yönteminin hangisi olduğu konusunda da yoğun tartışmalara neden olmaktadır. Günümüzde yaygın olarak kullanılmakta olan yardımcı üreme tekniklerinden IUI, in-vitro fertilizasyon (IVF) ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) gebelik oranlarını belirgin olarak arttırsa da özellikle IVF ve ICSI gibi yüksek maliyetli yöntemlerin açıklanamayan infertilite olgularında ampirik olarak uygulanmaları akılcı bir yaklaşım olarak görünmemektedir. Tedavi ile bu grupta gebelik oranlarının zamanlanmış cinsel ilişki ile %5, ovulasyon indüksiyonu sonrası IUI ile %10 ve IVF ya da ICSI ile %15-25 arasında olduğu bildirilmektedir (4). Bu verilere bakıldığında tüm tedavi olanaklarının kullanılması sonrasında bile açıklanamayan infertilite olgularının yaklaşık %70'inde gebelik elde edilemediği görülmektedir. Bu da gebelik mahsulünün endometriyal kaviteye implantasyonuna ilişkin bir problemin olabileceğini düşündürmektedir. Yapılan çalışmalarda yardımcı üreme tekniklerinin başarısını

sınırlayan en önemli noktanın implantasyon başarısızlığı olduğu gösterilmiştir (5). Buradan hareketle açıklanamayan infertilitede en önemli rolün endometriyuma ait olduğu düşünülebilir. Ancak, günümüzde fertilizasyonu objektif olarak gösterebilecek bir test olmadığından, bu gruptaki hastalarda temel problemin fertilizasyon sürecinden mi yoksa implantasyon sürecinden mi kaynaklandığı bilinmemektedir.

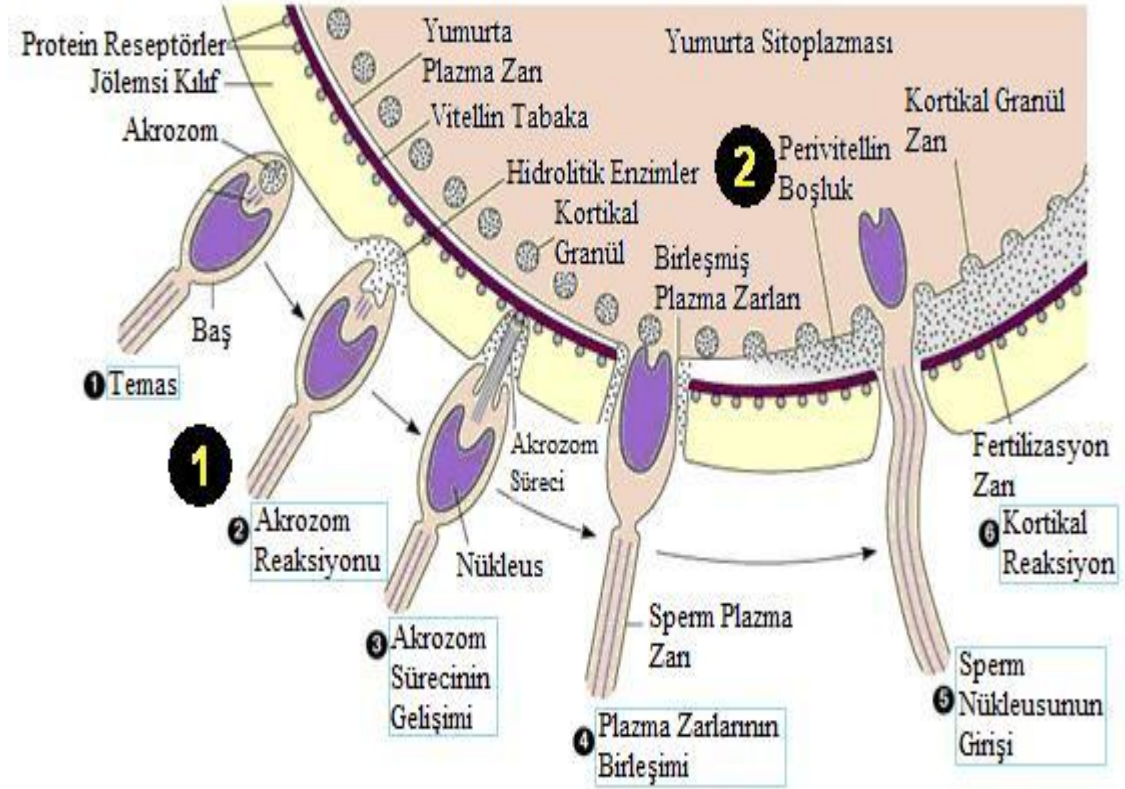
2.3. Fertilizasyon Süreci

Fertilizasyon gametlerin, yeni bir bireye dönüşecek olan zigotu oluşturmak için sitoplazmik ve nükleer parçalarının bir araya gelmesidir. Bu bir araya geliş tek bir olaydan ziyade birbirini takip eden olaylar zinciri şeklinde gerçekleşmektedir. Bu süreç, spermin korona radiata hücrelerine penetre olmasıyla başlar, oosit membranından geçtikten sonra maternal ve paternal kromozomların eşleşmesi ile sona erer.

Fertilizasyon sürecinde sperm, kadın genital sisteminde ilerlerken kapasitasyon denilen bazı biyokimyasal ve fonksiyonel değişikliklere uğrarlar. Kapasitasyon sürecinde, fertilizasyonun başarılı olması için mutlaka gerekli olan, sperm membranında glikoprotein ve lipidlerin yeniden moleküler düzenlemeleri ve iyon kanallarının aktivasyonu gerçekleşir (32). Ortamda bu düzenlemelere etki edebilecek herhangi bir fiziksel veya kimyasal faktörün varlığı kapasitasyonu bozarak fertilizasyonu engelleyebilir.

Kapasitasyonu tamamlanmış sperm tuba uterinada oositle karşılaştığında, ilk olarak oositin zona pellusidasını çevreleyen korona radiata hücreleri ile temas eder. Korona radiata, yüksek konsantrasyonda karbonhidrat, özellikle hyaluronik asit ve proteinden oluşan intersellüler matrikse sahip hücre tabakasıdır (33). Yüksek bazal kalsiyum (Ca^{+2}) seviyeleri sayesinde sperm membran proteini hyaluronik asite bağlanır ve hyaluronidaz aktivitesi ile N-asetilhekzosaminik bağları parçalayarak, aktif titreme ve kuyruk hareketi ile sperm korona radiatayı geçer (32). Ardından zona pellusidaya, zona pellusida proteinleri (ZP) üzerinden bağlanır ve akrozom reaksiyonu ile penetrasyon yarıkları oluşturarak zona pellusidayı geçer. Son olarak zona pellusidayı geçip oosit membranına ulaşmış olan spermin nükleusu oosit membranı yüzeyinde bulunan mikrovilluslar aracılığıyla sitoplazma içine alınır (32) (Şekil 2.1). Deoksiribonükleik asitlerini (DNA) replike ederek eş zamanlı olarak gelişen dişi ve erkek pronükleusları ovum merkezinde birleşir ve kromozomları birbiriyle eşleşir (34).

Bu noktada fertilizasyon tamamlanmış olup fertilize oosit artık zigot olarak adlandırılır. Kısaca değindiğimiz bu basamakların hepsinde, enzim veya ligand görevi gören birçok molekül ve Ca^{+2} , K^{+} ve Na^{+} gibi birçok iyon kanalı rol alır (32, 35, 36). Tüm bu hücrel ve moleküler etkileşimler sonucunda fertilizasyon süreci tamamlanmış olur, ancak sağlıklı bir gebelik için bu fertilizasyon ürününün uterus kaviteye taşınması ve buraya implantasyonu gerekmektedir.

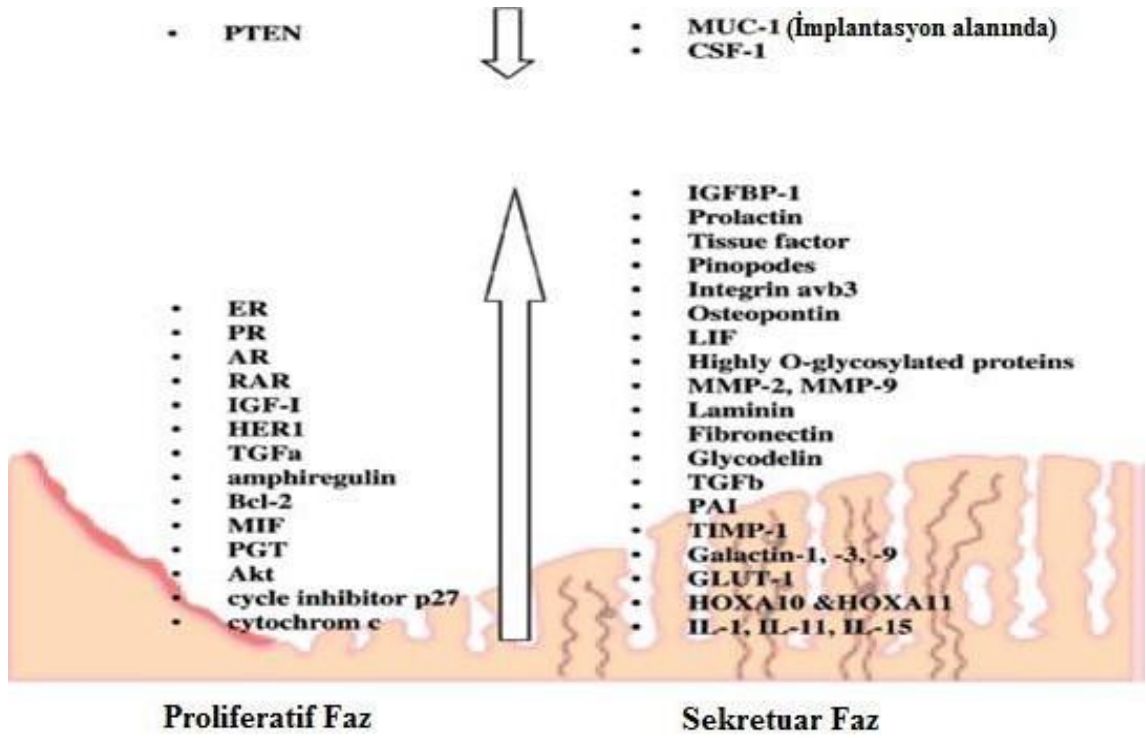


Şekil 2.1: Sperm ve oositin füzyonu [Inoue ve ark.'dan adapte edilmiştir (37)]

2.4. İmplantasyon Süreci

2.4.1. Endometriyal Siklus ve Reseptivite

Endometriyal siklusun her fazı, endokrin, parakrin ve otokrin faktörlerce regüle edilen, fonksiyonları tam olarak bilinen veya bilinmeyen birçok gen tarafından kontrol edilir. Bu faktörler Şekil 2.2’de özetlenmiştir.



Şekil 2.2: Proliferatif ve sekretuar fazda up veya down regüle olan faktörler (38)

2.4.2. Proliferatif Faz

Endometriyal dokunun ana özelliği, proliferatif fazdaki aktif proliferasyon ve oluşan yeni endometriyal dokunun nütrisyonel ihtiyacını temin edecek anjiyogenezistir. Proliferatif faz boyunca çok fazla proliferasyon gösteren endometriyum dokusuna bu süreçte gerekli besin maddelerini sağlamak için anjiyogenezis zorunlu bir süreçtir. Siklusun ilk bölümünde subepiteliyal pleksus ve bazal tabakadaki önemli bir artış ile menstrüel siklus boyunca anjiyogenezis gerçekleşir. Siklus boyunca major damarlar proliferatif fazı desteklemek amacıyla boyca uzarlar (39).

Proliferatif fazda apoptotik faktörler süprese edilmiş durumda bulunur (38). Siklusun bu fazı boyunca endometriyal dokunun yeterli gelişimi, implantasyon için mutlaka gerekli olan maturasyon sürecinin senkronizasyonu için oldukça önemlidir (40). Proliferatif fazdaki anahtar noktalardan biri östrojen seviyesinin artmasıdır.

Östrojen proliferasyon hücrelerini indükler ve indirekt bir etki olarak progesteron reseptörleri gibi steroid reseptörlerin ekspresyonunu stimule eder. Aynı zamanda östrojen fosfataz ve tensin homologları geninin (PTEN; phosphatase and tensin homolog) inhibisyonu yoluyla geç proliferatif dönemde hücrelerin yaşamının devamını sağlayan bir faktör olarak da etki eder (38). Endotelial büyüme faktörü (EGF; Endotelial Growth Factor) reseptörü ve onun ligandlarını da içeren EGF sistemi, transforme edici büyüme faktörü- α (TGF α ; Transforming Growth Factor- α), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF; Platelet Derived Growth Factor) gibi menstrüel siklus boyunca çok iyi regüle olan faktörler epiteliyal hücreler için mitojen olarak etki ederler (38).

Özetle; proliferatif faz anjiyogenezisi, proliferasyonu, anti-apoptotik süreci ve doku remodellingini (yeniden düzenlemesini) düzenleyen faktörlerin birbiriyle uyumuyla karakterizedir.

2.4.3. Sekretuar Faz ve Desidualizasyon

İnsanlarda menstrüel siklusun sekretuar fazı boyunca gerçekleşen morfolojik değişikliklerle karakterize desidualizasyon, konsepsiyondan bağımsızdır. Proliferasyonu baskılayan ve hücre farklılaşmasını indükleyen progesteron, siklusun bu ikinci döneminde ana hormondur ve etkisini kısmen de olsa progesteron tip A reseptörü (PR A) aracılığıyla gösterir (41, 42). Ayrıca, PR A en aktif transkripsiyon reseptörü olan progesteron tip B reseptörünün (PR B) baskılayıcısı olarak da rol alır. Bu fazda, PR B'nin glandüler epitel hücrelerinde azalmış olmasına rağmen stromada varlığını sürdürdüğü gözlenmiştir (43). Progesteronun etkisinin, çoğunlukla stromal kompartmandaki PR B aracılığı ile gerçekleştiği düşünülmektedir (38). Stromal hücre desidualizasyonu, prolaktin ve insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-1 (IGFBP-1; Insulin Like Growth Factor Binding Protein-1) gibi farklı desidual proteinlerin üretimi ve sekresyonuna eşlik eder (44-46).

Ovulasyon sonrası 7-10. günlerde, yaklaşık 48 saat süren belirli bir zaman aralığında, endometrium embriyo için kabul edici (reseptif) özellik göstermektedir; bu dönem 'implantasyon penceresi' olarak adlandırılmaktadır (47). Bu fazda, pinopod denilen, endometriyal epitelin apikal yüzeyinde kabarcık benzeri protrüzyonlar ortaya çıkar (48). Bu yapılar mikrovillileri aşacak biçimde uterin lümenin içine doğru uzanan birkaç mikrometre genişliğinde yapılar olup, önce fareler üzerinde yapılan

çalışmalarda tanımlanmış daha sonra da insan endometriyumunda gösterilmiştir (49-52).

Endometriyal pinopodların gelişimi, midluteal fazda lösemi inhibitör faktör (LIF; leukaemia inhibitory factor) ve onun reseptörünün ekspresyonu (53), progesteron (54) ve integrin $\alpha\beta3$ (55) ile ilişkilidir. Özellikle de menstrüel siklus boyunca pinopodların ilk belirmesi ile midluteal progesteron artışı arasındaki ilişki pinopod formasyonunun progesteron bağımlı olduğunu düşündürmektedir (48, 54).

Rolleri tam olarak bilinmiyor olsa da, pinopodlar embriyo-endometriyum etkileşiminin tercih alanları gibi görünmektedir. Blastokist tutunmasının endometriyal pinopodların tepesinde olduğu gösterilmiştir (56, 57). Bu nedenle blastokist adezyonu için gerekli olan reseptörlerin pinopodların yüzeylerinde yerleşmiş olduğu varsayılmaktadır. Diğer taraftan endometriyal reseptivite için ekspresyonu gerekli olan homeobox genlerden HOXA-10 geni pinopodların gelişimi için çok önemli bir role sahiptir. Gerçekten de, HOXA-10 ekspresyonunun blokajı pinopodların sayısında dramatik bir azalmaya neden olmaktadır. HOXA-10 hem endometriyal stromal hücre çoğalmasını hem de epitelial hücre morfolojilerini düzenleyerek bu süreçte önemli rol oynar (58).

Bu morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler sonucunda endometriyum siklusun 20-24. günleri arasında blastokistin implantasyonu için hazırlanmış, reseptif hale gelmiş olur (58).

2.4.4. İmplantasyon

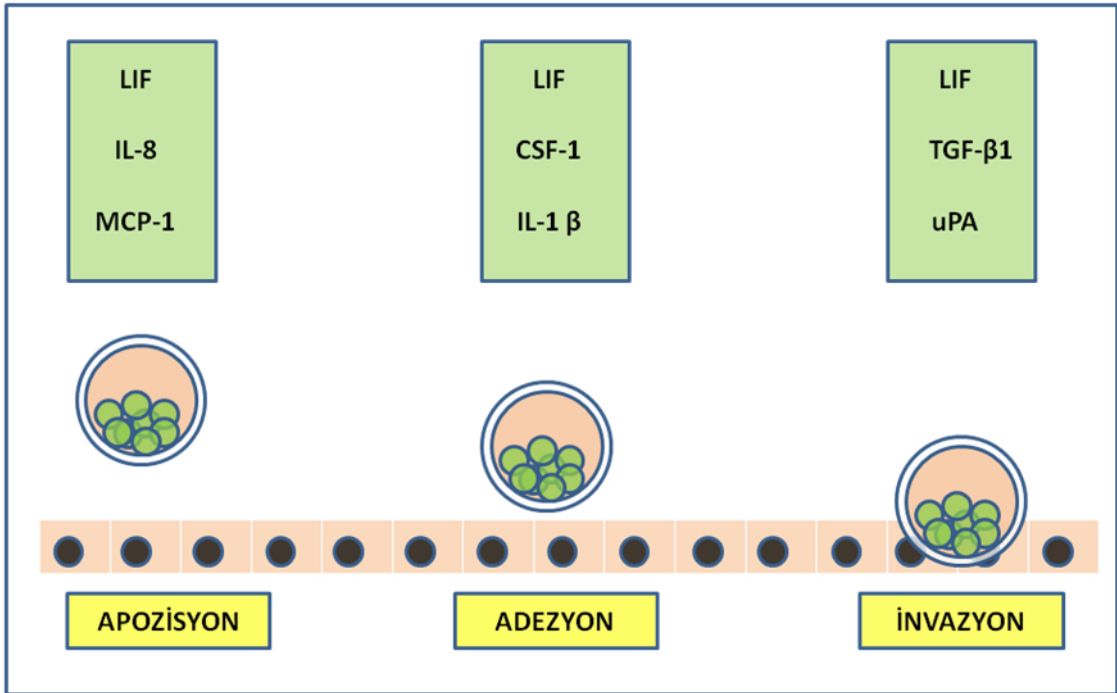
Embriyo implantasyonu, çoğu canlı türünde üreme sürecinin en kritik basamağını temsil etmektedir. İmplantasyon, maternal dolaşım ile fetus arasında bir arabirim olan, plasentanın oluşumunu sağlamak üzere blastokist ile maternal endometriyal yüzey arasında tam bir bağlanma olan benzersiz bir biyolojik fenomendir (59, 60). Başarılı bir implantasyon, reseptif bir endometriyum, blastokist gelişim aşamasında normal fonksiyonel bir embriyo ve bu iki yapı arasında senkronize bir diyalogu gerektirir (61).

İnsan embriyosu ovulasyon sonrası 6. günde blastokist haline geldikten sonra implantasyon sürecine girer, ancak implantasyon gerçekleşmeden önce hem endometriyum hem de embriyo endokrin, otokrin ve parakrin mesajlarla implantasyona hazır hale gelir (47). İmplantasyon süreci 3 aşamada incelenebilir;

apozisyon, adezyon ve invazyon. Blastokist apozisyonu sürecinde, trofoblast hücreleri reseptif endometriyal epitele bağlanır. Daha sonra blastokist endometriyal bazal tabakaya ve stromal ekstraselüler matriksin içine doğru invaze olarak yerini sağlamlaştırır. Bu noktada, embriyo ile endometriyum arasında uterin flushing (yıkama) ile bozulmayacak sağlamlıkta bir bağlantı kurulmuş durumdadır. Takiben invaziv blastokistin luminal epitele penetrasyonu gerçekleşir (58).

İnsanda blastokistin farklı dokulara implante olma yeteneği olsa bile, şaşırtıcı bir biçimde endometriyumda bu fenomen kendi kendini sınırlar ve düzenli menstrüel siklusa sahip kadınlarda siklusun 20. ve 24. günleri (LH+7 ile LH+11. günler arası) arasındaki periyodu kapsayan bir dönemde meydana gelir (58). İmplantasyon penceresi (62) olarak adlandırılan bu evrede, ovaryan steroid hormonlar tarafından başlatıldığı farz edilen tam bir morfolojik ve fonksiyonel reseptif durum kazanmış olan endometriyum, blastokistin yapışmasına hazırdır (63).

İmplantasyon gebeliğin oluşması için çok önemli olan karmaşık bir dizi olayı kapsar. Bu erken fetomaternal ilişkiyi sağlayan ve ovaryan hormonların etkisi altında olan çok sayıda moleküler mediyatör tanımlanmıştır. Bu mediyatörler arasında, adezyon molekülleri, sitokinler, growth faktörler ve lipidler başta olmak üzere çok sayıda değişik moleküller bulunur (61), (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: İmplantasyon basamaklarında etkili moleküller. Leukemia Inhibitory Factor (LIF), Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1), Ürokinaz Plazminojen Aktivatör (uPA) [Attar R ve ark.'dan adapte edilmiştir (47)].

Türlerin soylarını sürdürmeleri için üremenin vazgeçilmez olduğu göz önünde bulundurulunca implantasyon sürecinde başarısızlık bir paradokstur. İmplantasyon başarısızlığı üreme sağlığının henüz çözülmemiş bir sorunu olarak durmaktadır. Açıklanamayan infertilite tanısı konulan kadınların infertilitesinin ana nedeni olduğu düşünülmektedir. Gerçeği söylemek gerekirse IVF'te ortalama implantasyon oranları yaklaşık %25'tir (64). Embriyonun kendisi başarısız implantasyonların sadece 1/3'ünden sorumlu iken, yetersiz uterin reseptivite başarısız implantasyonların yaklaşık 2/3'ünden sorumludur (65, 66).

2.4.4.1. İmplantasyonun Aşamaları

2.4.4.1.1. Apozisyon ve Adezyon

Apozisyon ve adezyon süreçleri, endometriyum ile blastokist arasında, birçok molekülün birbiriyle karmaşık ilişkileri sonucunda gerçekleşir. Endometriyumdaki adezyon moleküllerinden, üzerinde en çok çalışılanı integrin grubudur. İntegrinlerin α ve β subünitleri olup bunlar birbirlerine non-kovalent bağlarla bağlanmıştır. İntegrinler, ekstrasellüler alanda bulunan fibronektin, kollajen ve laminin gibi çeşitli ekstrasellüler matriks (ECM) ligandlar için bir reseptör görevi görürler. (67). Endometriyal epiteliyal hücreler üzerinde sürekli olarak eksprese olan integrinler $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ ve $\alpha 6\beta 4$ integrinleridir. Stromal hücreler üzerindeki daimi integrin ise fibronektin reseptörü olan $\alpha 5\beta 1$ 'dir. Çoğu integrin siklus-bağımlı ekspresyon gösterir. İmplantasyon sürecindeki en önemli integrinin $\alpha v\beta 3$ olduğuna dair kanıtlar vardır (55). Bu integrin osteopontin ile karşılıklı lokalizedir ve EGF tarafından stimule edildiği gösterilmiştir (68). Açıklanamayan infertilite, luteal faz yetmezliği, endometriyozis ve hidrosalpenks gibi infertilite ile ilişkili birçok durum $\alpha v\beta 3$ integrinin düşük ekspresyonuna eşlik etmektedir (69-72).

EGF sisteminin endometriyumdaki rolü henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Siklus boyunca insan endometriyumunda EGF ekspresyonu hakkındaki veriler çelişkilidir. Siklus fazı dikkate alınmadığında, bazı araştırmacılar endometriyumda EGF'yi gösterememişlerdir (73). Bazı araştırmacılar ise epitelyum hücrelerinde veya epitelyum ve stromada siklus-bağımlı şekilde EGF ekspresyonunu tanımlamışlar (74, 75).

Çoğu epiteliyal hücrelerin apikal yüzeyleri kalın bir glikokaliks tarafından korunmaktadır. Bu glikokaliksin miktar olarak en büyük kısmını, hücre yüzeyini patolojik süreçlerden koruduğuna inanılan mucin-1 (MUC1) oluşturur. MUC1'in hücresel adezyona engel olduğu varsayılmaktadır (76). Uterin kaviteye giren embriyonun muhtemelen karşılaştığı ilk molekül MUC1'dir. MUC1'in implantasyon için doğru yer ve doğru zamanı buluncaya kadar blastokiste hareket olanağı sağladığı düşünülmektedir (77). İmmünohistokimya ile elektron mikroskopunun birlikte kullanıldığı çalışmalarda sadece silialı hücrelerde MUC1'in kesin olarak varlığı gösterilebilmiştir. Buna karşılık, non-silialı hücrelerde ve pinopodların yüzeylerinde MUC1 gösterilememiştir (78). Pinopodların öneminin, embriyo-endometriyum etkileşimini inhibe eden MUC1'in olmadığı bir alan sağlamak olduğu düşünülmektedir. Gerçekten de in-vitro implantasyon modelleri embriyonun MUC1'in kaybolduğu alana yapıştığını göstermektedir (79). Bununla birlikte, blastokist hücre yüzeyinde eksprese olan veya blastokistin kendisinden salgılanan bazı faktörlerin MUC1'in implantasyon alanındaki lokal kaybını başlatabileceği öne sürülmüştür (80).

Fonksiyonel bir LIF genine sahip olmayan fare modeli çalışmasında implantasyonda LIF'in rolü gösterilmiştir. Defektif LIF geni açısından homozigot dişi fareler erkek farelerle çiftleştirilmiş ve embriyoların endometriyuma tutunamadığı ve implante olamadığı gösterilmiştir (81). Ancak insanlar üzerindeki veriler hala çok sınırlıdır. Fertil kadınlarla karşılaştırıldığında, çoğu idiopatik infertil kadının uterin yıkama sıvısında LIF tespit edilememiştir ve bazı infertil kadınlarda LIF genini kodlayan bölgede mutasyonlar gösterilmiştir (82, 83). LIF messenger ribonucleoprotein (mRNA) glandüler epitelde, stromaya kıyasla, 3 kat daha fazla eksprese olur. Siklus-bağımlı olarak proliferatif faz ile karşılaştırıldığında tercihen sekretuar fazda eksprese olmaktadır (84).

Embriyo zona pellucidadan kurtulduktan sonra L-selektin eksprese eder. Epiteliyal yüzeydeki oligosakkaridlere bağlanan L-selektin, blastokisti yavaşlatır ve integrinlerle, embriyonun implantasyonunu sağlayacak sıkı bir etkileşimin olmasına olanak sağlar (58).

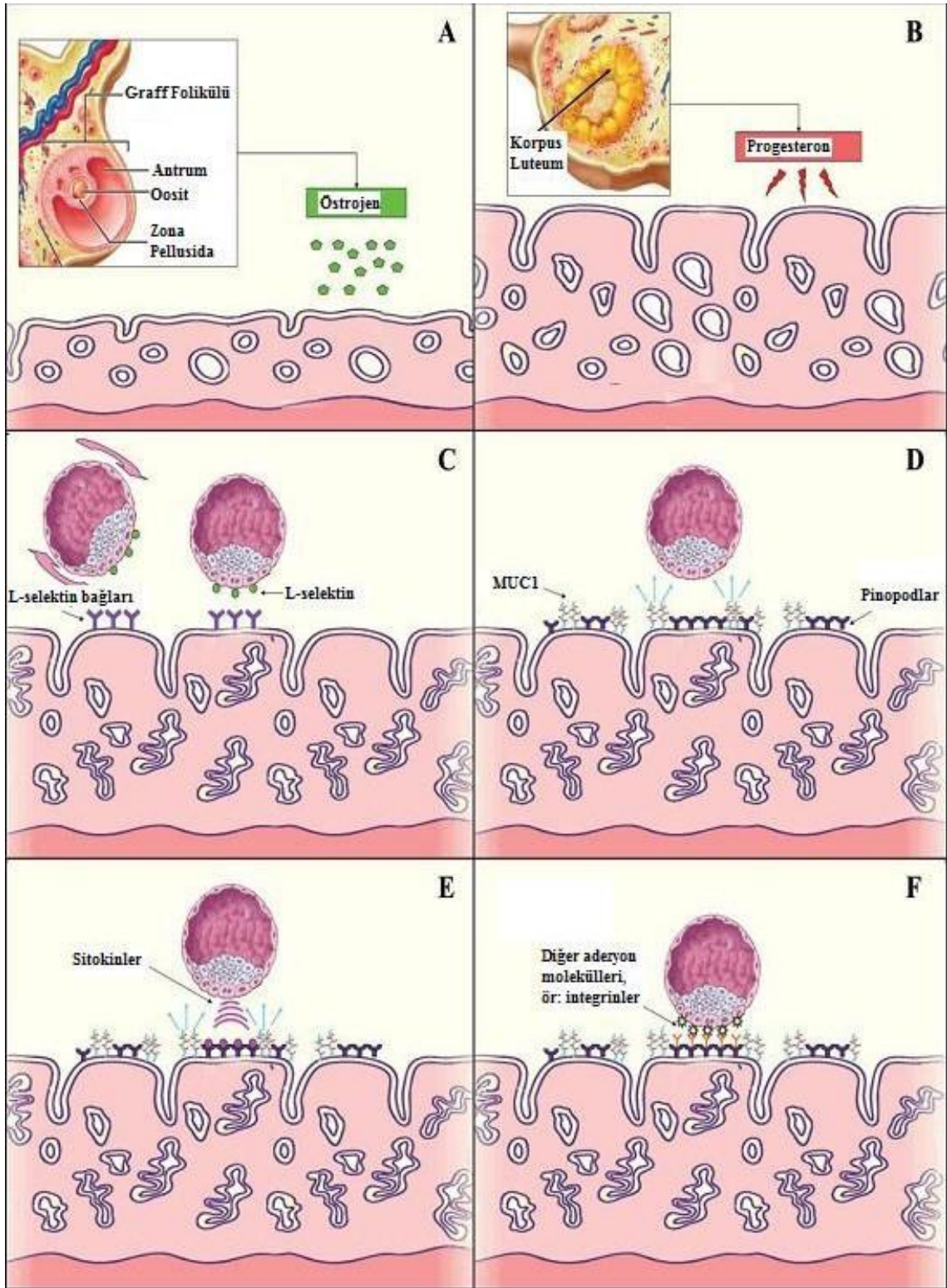
2.4.4.1.2. İnvazyon

Apozisyon ve adezyon süreçlerinden sonra endometriyuma yapışmış olan blastokist yerini sağlamlaştırmak üzere endometriyal stromayı istila eder. Bu süreçte en önemli rolü invaziv sitotrofoblastlar oynar. İnvaziv sitotrofoblastlar endometriyuma integrinler vasıtasıyla bağlandıktan sonra (Şekil 2.4), ECM’i ürettikleri proteazlar ile sindirirler. Bunlar serin proteaz, katepsin ve çinko bağımlı matriks metalloproteinaz (MMP) olup, ECM’yi sindirebilecek kabiliyete sahiptirler (85). İmplantate embriyonun trofoblast hücreleri epitelial hücre tabakasını geçtikten ve yerlerini sağlamlaştırmak amacıyla endometriyal stromayı istila ettikten sonra besin maddelerine erişmek için düşük basınçlı sirkülasyon ortamı oluşturmak amacıyla maternal damarları istila ederler.

İmplantasyon süreci boyunca, özellikle MMP-2 ve MMP-9 başta olmak üzere ECM-sindirici proteazlar üretilir (86). Bu proteazların invazyon amacıyla ECM’yi sindirme işlemi laminin, fibronektin, IGFBP-1 ve TGF- β tarafından kontrol edildiği düşünülmektedir (87-91). Bunların yanı sıra, implantasyondaki rolü tam olarak bilinmeyen koloni stimüle edici faktörün üretiminin implantasyon penceresi boyunca azaldığı ancak Glycodelin A’nın üretiminin ise arttığı gösterilmiştir (92, 93).

HOXA10 ve 11 iyi bilinen, menstrüel siklusun mid-luteal fazında dramatik bir biçimde artarak eksprese olan ve endometriyal farklılaşmayı kontrol eden genlerdir. HOXA10’nun yokluğunun farelerde implantasyon başarısızlığına neden olduğu gösterilmiştir. Ancak kesin fonksiyonu henüz tam olarak açıklanamamıştır. Sadece farelerde değil insanlarda da hidrosalpenks, endometriyozis ve polikistik over sendromu gibi infertiliteyle ilişkili hastalıklarda endometriyal HOXA10’nun ekspresyonunda azalma olduğu gösterilmiştir (94, 95).

İmplantasyonda rol oynadığı gösterilmiş olan tüm bu faktörlerin (Şekil 2.4) yanı sıra başarılı bir embriyo implantasyonu için önemli olan yeni moleküllerin keşfi, araştırmacılara bu alanda değerli fikirler sunmuştur. Bununla birlikte, bu süreci yönlendiren moleküler mekanizmalar ile ilgili birçok soru hala cevaplanmayı beklemektedir.



Şekil 2.4: İnsan embriyosunun uterusu implantasyonu. (A) Östrojen seviyesinin artmasıyla endometriyal proliferasyon. (B) Lüteinize folikülden salgılanan progesteron endometriyal farklılaşmayı başlatır. (C) Blastokist tuba uterinadan uterin kaviteye gelir ve L-selektinler aracılığıyla endometriyum yüzeyinde serbestçe yuvarlanır. (D) Mucin-1 (MUC-1) blastokistin, başarılı implantasyon şansı düşük olan endometriyal alanlara, implante olmasını önerir. (E) Kemokinler ve sitokinler blastokisti optimum implantasyon noktasına çekerler. (F) Adezyon molekülleri (örneğin; integrinler ve kadherinler) blastokisti, başarılı bir implantasyonun olacağı alanda, pinodlara sıkıca bağlarlar [Achache ve ark.'dan adapte edilmiştir (58)].

2.5. Ağır Metaller ve Üreme Sağlığı Üzerine Etkileri

Ağır metal tanımı fiziksel özellik açısından yoğunluğu 5 g/cm^3 'ten daha fazla olan metaller için kullanılır. Bu gruba kurşun, kadmiyum, krom, demir, kobalt, bakır, nikel, civa, arsenik ve çinko olmak üzere 60 tan fazla metal dahildir. Tıpta ağır metal tanımı daha geniştir ve atomik ağırlıklarına bakılmaksızın tüm toksik metalleri içerir (96). Ağır metaller yerkabuğunda genellikle doğal olarak bulunan bileşiklerdir. Bozulmaz ve yok edilemezler. Antik çağlarda bu metallerin cevherleri işlenmeye başlandığından beri metaller insan faaliyetleri sonucu olarak doğal çevrimleri dışında doğaya yayılmaya başlamıştır. Yüzyıllar boyunca insanlar ağır metalleri etkilerini bilmeden; takı, silah, su borusu üretimi vb çeşitli amaçlar için kullanmıştır. Sanayileşme ile birlikte ağır metal içeren kömürlerin yakılmaya başlanması ile endüstri bölgelerindeki ağır metal kirliliği aşırı boyutlara ulaşmıştır. Günümüzde kâğıt sanayi, çimento üretimi, petrokimya, klor-alkali üretimi, gübre sanayi, demir-çelik sanayi, cam üretimi, çöp ve atık çamur yakma işlemi, termik ve nükleer enerji üretiminin farklı işlem kademelerinden biyosfere ağır metal atılımı gerçekleştiği bilinmektedir (12).

Havaya atılan ağır metaller, sonuçta karaya ve buradan da bitkiler ve besin zinciri yoluyla da hayvanlara ve insanlara ulaşır. Aynı zamanda insan ve hayvanlar tarafından havadan aerosol olarak veya toz halinde solunurlar. Ağır metaller endüstriyel atık suların içme sularına karışması yoluyla veya ağır metallerle kirlenmiş partiküllerin tozlaşması yoluyla da insanlar ve hayvanlar üzerinde etkin olurlar. Ayrıca sanayileşmeye paralel olarak kırdan kente doğru göçlerin yaşanması toksik metallerin insan maruziyeti boyutlarının da giderek artmasına neden olmaktadır.

Ağır metallerin belirli bir zaman aralığında canlı organizmada diğer metallere kıyasla akümülyasyonunun fazla olması sağlık üzerine olumsuz etkilerinin daha ciddi boyutlara ulaşmasına yol açmaktadır.

İz elementler gibi bazı ağır metaller (örneğin bakır, selenyum, çinko) insan vücudunun metabolizmasını sürdürmek için elzemdir. Ancak yüksek konsantrasyonlarda toksik olabilirler. Bunun yanı sıra metabolizma için gerekli olmayan kurşun, kadmiyum, civa ve arsenik gibi metaller düşük konsantrasyonlarda bile hücresel düzeyde toksik etkiler gösterebilirler.

2.5.1. Kadmiyum (Cd)

Kadmiyum yumuşak ve mavimtrak bir metaldir. Nemli havada yavaş yavaş oksitlenir; oksit kararlı olup, metali kaplar. Atom numarası 48 ve atom ağırlığı 112.40 g/mol. Kadmiyum 321°C'de erir, 767°C'de kaynar. Oldukça elektropozitiftir. Bileşiklerinde "+2" değerlikli haldedir. Kadmiyumun 104Cd ile 118Cd arasında bir seri izotopu mevcuttur. Tabiatta en çok bulunan 110Cd ve 114Cd izotoplarıdır. Kadmiyum mineralleri yer kabuğunun yaklaşık % 0.01'den azını teşkil eder. Kadmiyum elde etmek için işlenen başlı başına bir mineral mevcut değildir. Genellikle minerallerde çinko ile beraber olarak bulunur. En önemli kaynağı, metal sanayinde çinkonun distilasyonla saflaştırılması esnasında çıkan baca dumanlarıdır. Ayrıca kadmiyum, bakır ve kurşunun eritilmesinden elektrolitik metotla çinko elde edilen fabrikalarda litopon artıklarından elde edilebilir. Kadmiyumun en önemli kullanım yeri çelik kaplamacılığıdır. Çünkü çok kolay kaplanır ve oksidasyona dirençli, kararlı bir yüzey meydana getirir. Bilye yatakları gibi sürtünme olan yerler, sürtünmeyi azalttığı için kadmiyumla kaplanır. Nükleer reaktörlerde nötron tutucu olarak, fotoğraf malzemeleri, nikel kadmiyum pilleri, düşük erime noktalı lehim yapımı, akümülatör, boya ve cam üretimi gibi önemli kullanım alanları vardır (97).

Kadmiyum çok toksik bir metal olup sanayileşmiş toplumlarda en önemli çevre kirleticilerinden biridir. Toplum için en önemli iki maruziyet kaynağı diyet ve tütün içimidir (98). Kadmiyum yaşam boyunca insan vücudunda birikir ve renal disfonksiyona neden olabilir (99). Renal hasarın yanı sıra akciğer, karaciğer, kemik, over gibi pek çok dokuda kadmiyumun zararlı etkiler oluşturabildiği hayvan deneylerinde gösterilmiştir (16). Kadmiyum üreme sistemi üzerine toksisitesi en iyi bilinen metallere aittir. Laboratuvar hayvanlarında steroidogenez ve spermatogenez bozduğu gösterilmiştir. Androjen ve östrojen reseptörlerine (ER) bağlanabilme özelliği (18) ile fertilité üzerine yapılan araştırmalarda ilgi uyandırmıştır. Nampoothini ve Gupta (8), kadmiyum ve kurşunun, granüloza hücrelerinde steroidojenik enzim aktivitesini düzenleyen gonadotropinlerin bağlanmasında anlamlı biçimde azalmaya neden olduğunu ve böylece infertiliteye yol açtığını göstermiştir.

2.5.2. Kurşun(Pb)

Kurşun, atom numarası 82 ve atom ağırlığı 207.19 g/mol olan mavi-gümüş rengi karışımı bir elementtir. 327.5 °C de erir ve 1740 °C de kaynar. Doğada, kütle numaraları 208, 206, 207 ve 204 olmak üzere 4 izotopu vardır. Doğal olarak bulunabilen metaller arasında yer alan kurşunun en çok rastlanılan cevherleri, sülfür minerali galen (PbS) ve onun oksitlenmiş ürünleri olan serüsit (PbCO₃) ve anglezittir (PbSO₄) (99).

Kurşun hava, su ve toprak yoluyla, solunumla veya besinlere karışarak biyolojik sistemlere giren son derece toksik özelliklere sahip bir metaldir. Her yıl çıkarılan ve rafine edilen tonlarca metalden en önemlisi kurşundur. Özellikle araçlarda ve evlerde yakılan petrol ürünlerinden ve kontamine kömür kullanılan enerji santrallerinden çevreye yayılan kurşun partiküllerinin inhalasyon yoluyla alınması önemli bir çevresel maruziyet biçimidir. Kurşun yer altı sularının kontaminasyonu, özellikle eski yapılarda mutfak ve banyolarda kullanılan armatürler, kurşun ile cilalanmış seramik, kurşun içeren cam sürahiler ve kurşun içeren metal alaşımlardan yapılmış saklama kaplardan yiyecek ve içeceklere geçebilir ve böylece sindirim yoluyla vücuda geçebilir (100). Evlerin dış cephelerini boyamak için kullanılan “kendi kendini temizleyen” dış cephe boyalarındaki veya çatı ve bacalarda biriken kurşun konutların çevresindeki toprağa bulaşmaktadır. Buralarda toprakla oynayan ve hatta toprak yiyen çocuklarda anlamlı düzeyde kurşun maruziyeti söz konusu olabilir (6).

Kurşun maruziyeti insanda birçok istenmeyen etkiye neden olabilir; örneğin, hemoglobin biyosentezinde aksama ve anemi, hipertansiyon, böbrek hastalıkları, nörolojik hasar, çocuklarda öğrenme kabiliyetinde azalma, saldırganlık ve hiperaktivite gibi davranış bozuklukları (14). Bunların yanı sıra kurşun gibi mesleki veya çevresel maruziyeti olabilen ağır metallerin insan üreme sistemi üzerine olumsuz etkilerinin olduğu bilinmektedir (15). Hem epidemiyolojik hem de hayvanlar üzerinde yapılan araştırmaların deneysel verileri, kurşunun farklı konsantrasyonlarda erkek üreme sistemi (spermatogenezis, sperm fonksiyonel parametreleri ve üreme hormonları) üzerine geniş bir toksisite spektrumuna sahip olduğunu göstermektedir (7). Kurşun maruziyetinin istenmeyen etkileri genellikle yüksek seviyelerde ortaya çıkmasına rağmen (101), uzun süreli düşük doz maruziyeti de erkek üreme sistemi üzerinde yüksek doz kurşun maruziyetine benzer etkilere neden olabilmektedir (17).

2.5.3. Civa (Hg)

Civa gümüş renkli, ağır bir metal olup oda sıcaklığında sıvı halde bulunur. Atom numarası 80, atom ağırlığı 200.59 g/mol, donma noktası -38.83 °C ve kaynama noktası 356.73 °C'dir. Civa doğal olarak meydana gelen bir metaldir ve birkaç formu vardır; diş dolguları ve termometrelerde kullanılan metalik veya elementer civa, cilt bakımı ve tıbbi ürünlerde kullanılan inorganik civa bileşikleri ve mantar ilaçları, boyalar ve diyetle (kontamine balıklarda) bulunan organik civa (97). Atmosferde bulunan civanın büyük kısmı su ve toprakta depolanabilen elementer civa buharı ve inorganik civa formundadır. Civa buharı yüksek lipofiliktir ve akciğer ve oral mukozadan etkin bir biçimde absorbe olabilir (102). Toprak gübrelerinin doğrudan uygulanması ve mantar ilaçları, deri tabaklama, atık su arıtma tesisleri, kağıt fabrikaları, pil ve termometre gibi çöplere atılan katı atıklar, hayvan dokularında biriken çevredeki civanın ana kaynaklarıdır (103).

Genel popülasyon öncelikle diyet ve diş dolgusunda kullanılan amalgam ile civaya maruz kalmaktadır (104). Kimyasal form ve maruziyet biçimine bağlı olarak civanın ve bileşiklerinin geniş bir toksisite spektrumu bulunmaktadır (105). Civanın spontan abort, ölü doğum, konjenital malformasyonlar, infertilite, menstrüel bozukluklar ve ovulasyon inhibisyonu gibi üreme problemlerine neden olabileceği yapılan derleme çalışmalarında gösterilmiştir (9, 10).

2.5.4. Arsenik (As)

Arsenik atom numarası 33, atom ağırlığı 74.91 g/mol, erime noktası 614, kaynama noktası 820 olan metal ile ametal arasında bir özelliğe sahip elementtir. Arseniğin üç allotropu mevcuttur. Bunlardan gri arsenik metalik halde bulunur ve kararlıdır, yoğunluğu büyüktür. Sarı arsenik ametalik halde olup dört atomlu As_4 moleküllerden meydana gelir, uçucudur ve arsenik buharının ani soğutulması ile elde edilir. Amorf olan siyah arsenik ise arsin'in (AsH_3) ısı ile bozunmasından elde edilir. Metalik olan gri arsenik 610 derecede sıvı hale geçmeden katı halden doğrudan buhar haline geçer. Arsenikli bileşikler, böcek ve tarım ilaçları, fare zehiri, bazı kanser ilaçları, boya, duvar kağıdı, seramik gibi çeşitli ürünlerin imalatında kullanılır. Arseniğin toksik etkilerinin, vücuttaki bazı enzimlerle birleşerek hücre metabolizmasına bozucu etkide bulunmasından ileri geldiği zannedilmektedir (97).

Son yıllarda yer altı sularının arsenik ile kirlenmesi, tüm dünyanın bir sorunu olarak kabul edilmiştir. Arsenik tarımsal pestisidlerin, ahşap koruyucuların ve camın üretiminde, metalurji uygulamalarında ve tıp alanında birçok üretim sürecinde bir katalizör olarak yaygın kullanılan toksik bir elementtir. Bu eser element doğal kaynakların yanı sıra insan kaynaklı faaliyetler sonucunda da atmosfere salınmaktadır. 1978'den beri hem endüstriyel faaliyetler hem de sulama için yer altı sularının gittikçe artan kullanımı, içme suyunun arsenik ile kirlenmesinde, dolayısıyla insanların arseniğe maruziyetinde artışa neden olmuştur (106).

Arsenik ile kontamine suyun kronik içiminin, hiperpigmentasyon, keratozis, periferik nöropati, cilt ve akciğer kanseri, periferik damar hastalığı gibi birçok toksik etkisi olduğu epidemiyolojik çalışmalarda gösterilmiştir (107). Arseniğin üreme sistemi üzerindeki olası toksisitesine ilişkin bilgilerimiz çok sınırlı olmakla birlikte kontamine suların içimi ile üreme sonuçlarını ilişkilendiren çalışmalarda arseniğin üreme üzerine olumsuz etkileri olduğu bildirilmiştir (19). İçme suyuna arsenik katılarak yapılan hayvan çalışmalarında, arseniğe maruz bırakılan hayvanlarda doz bağımlı olarak plazma LH, FSH ve östrojen seviyelerinde azalma gösterilmiş ve ayrıca bu hayvanların over, uterus, vajen ve plazmalarında arsenik saptanmıştır (20).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi İnsan Etik Kurulu'nun 2010/167 araştırma protokol numaralı izninin alınmasından sonra, 2011 yılında İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi TÖTM Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda yapıldı. Olgular, çalışma hakkında bilgilendirilerek alınacak örneklerin bilimsel araştırma amacıyla kullanılacağı bilgisini içeren aydınlatılmış onamları alındıktan sonra çalışmaya dahil edildi.

Çalışmada, TÖTM Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı infertilite polikliniğine başvuran ve yapılan tetkik ve incelemeler sonucunda primer açıklanamayan infertilite tanısı konulan 19 kadın olgu ile kontrol grubu olarak, jinekoloji polikliniğine genel kontrol veya smear taraması için başvuran ve en az 1 tane canlı doğum yapmış olan 18 kadın olgu olmak üzere toplam 37 kadın olgu değerlendirilmeye alındı.

Çalışmaya alınacak hastalar belirlenirken;

-Dismenore öyküsü olan,

-Sigara veya alkol kullanan,

-Son 3 ay içinde ovulasyon indüksiyonu yapılan,

-Son 3 ay içinde oral kontraseptif kullanan,

-Yaşamının herhangi bir döneminde RİA kullanma öyküsü olan,

-Son 1 yıl içinde pelvik inflamatuvar hastalık öyküsü olan,

-Metabolik hastalık, kalp damar hastalığı veya diyabet öyküsü olan,

-Vajinal muayenede enfeksiyon bulgusu olabilecek akıntısı olan ve

-Kendisi veya partneri üreme sistemiyle ilgili herhangi bir ameliyat (tubal pasaj değerlendirilmesi amacıyla yapılan laparoskopi hariç) geçirmiş olan olgular çalışma dışında bırakıldı.

Bu olguların tümünde infertiliteye yönelik tam bir değerlendirme yapılmıştır. Çalışmanın amacına yönelik öyküde olgunun yaşı, obstetrik öyküsü (gravida, parite, abortus, yaşayan çocuk sayısı), ilk adet tarihi, adet düzeni (aralık/süre/miktar), dismenore, disparoni, post koital ağrı, kötü kokulu vaginal akıntı ve/veya kaşıntı, geçirilmiş pelvik enfeksiyon, galaktore, kılınma artışı, tanı almış metabolik hastalık, kalp damar hastalığı, diyabet ve tiroid hormon bozuklukları, sigara-alkol alışkanlıkları, son 3 ay içinde ovulasyon indüksiyonu veya kontrasepsiyon amacıyla hormonal ilaç

kullanımı, RIA kullanımı, kendisi veya partnerinin geçirdiği cerrahi operasyonlar sorgulandı. Olguların kurşun ve boya gibi çevresel etkenlere mesleksi veya yaşam koşullarında maruziyeti olup olmadığı değerlendirildi.

Fizik muayenede kilo ve boy bakılarak vücut kitle indeksi (VKİ) (kg/m^2) hesaplandı. Pelvik muayenede dış genital organlar, vajen, serviks, uterus ve adneksiyal alanlar değerlendirildi. Ayrıca, olgular koital aktiviteye engel olabilecek anatomik nedenler açısından da değerlendirildi.

Laboratuvar tetkiklerinde A3'te FSH, LH, E₂, prolaktin, TSH düzeyleri ve beklenen adet tarihinden bir hafta önce (midluteal) progesteron düzeyi bakıldı. TvUSG ile uterin, ovaryan ve adneksiyal alanlar değerlendirildi. Tubal pasajın değerlendirilmesi için HSG çekildi ve erkek faktör araştırması için spermiyogram bakıldı. Spermiyogramlar DSÖ'nün 2010 kriterleri esas alınarak değerlendirildi (108).

Tüm bu değerlendirmeler sonucunda hiç gebelik yaşamamış, partnerinin spermiyogramı normal, A3 hormon düzeyi normal, plazma progesteron düzeyi >5 ng/dl, HSG'de her iki tubadan peritoneal geçiş izlenen; yani "primer açıklanamayan infertilite" tanısı konulan hastalardan ve kontrol grubundan siklusun 20-24. günleri arasında endometriyal biyopsi ile endometriyal doku örnekleri alındı. Elde edilen endometriyal dokuda atomik absorpsiyon spektrometresi yöntemiyle kadmiyum, kurşun, civa ve arsenik düzeyleri bakıldı ve bu metallerin endometriyal dokudaki seviyeleri karşılaştırıldı.

3.1. Gereç

1. Numuneler
2. Kullanılan Aletler
3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

3.1.1. Numuneler

Siklusun 20-24. günleri arasında alınan endometrial doku örnekleri.

3.1.2. Kullanılan Aletler

1. Litotomi Masası
2. Vajinal Spekulum
3. Tek dişli

4. Endosampler Biopsi Katateri (MedGyn, ABD)
5. Ependorf tüpleri
6. Dondurucu (-86 °C) (New Brunswick Scientific, ABD)
7. Otomatik Pipetler
8. Hassas terazi (Mettler Toledo, ABD)
9. Polipropilen, Kapaklı Tüpler (10 ve 15 ml)
10. Su Pürifikasyon Sistemi (Millipore, ABD)
11. Sıcak Su Banyosu (GFL 1083, Almanya)
12. Atomik Absorbsiyon Spektrometresi (Perkin Elmer AAnalyst 800, ABD)
13. Sample Cup 1.2 ml Vial
14. Argon Tüpü

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

1. Ultra-Saf Su
2. Nitrik Asit (HNO₃, %65) (Merk, ABD)
3. Hidroklorik Asit (HCl, %35) (Merk, ABD)
4. Pb Standart (Perkin Elmer AA Standart Custom-Grade, ABD)
5. Cd Standart (Perkin Elmer AA Standart Custom-Grade, ABD)
6. Hg Standart (Perkin Elmer AA Standart Custom-Grade, ABD)
7. As Standart (Perkin Elmer AA Standart Custom-Grade, ABD)

3.2. Yöntem

3.2.1. Numunelerin Alınması ve Saklanması

Tüm olgular siklusun 20-24. günleri arasında, litotomi masasında hazırlandıktan sonra vajinal spekulum takıldı, takiben serviks tek dişli ile tutuldu ve endosampler biopsi katateri negatif basınca alındıktan sonra kaviteye girildi, vakum yöntemiyle endometriyal örnekler alındı. Alınan örnekler ependorf tüpüne konuldu ve analiz zamanına kadar -86 °C dondurucuda saklandı.

3.2.2. Numunelerin Analiz Öncesi İşlemleri

Örnekler -86 °C dondurucudan çıkarıldı ve bir gece boyunca çözülmeye bırakıldı. Çözülen örnekler, üzerindeki tüm kan uzaklaştırılncaya kadar ultra saf su ile yıkandı. Kurutma kağıdı ile örneklerdeki fazla su uzaklaştırıldıktan sonra örnekler yaş olarak tartıldı ve ağırlık standardı oluşturmak için her örnekten 150±10 mg doku

alınarak 10 ml'lik propilen tüplere konuldu. Bu 10 ml'lik propilen tüplerdeki doku örneklerinin üzerine 1 ml %65 HNO₃ (Merck) ve 1 ml %35 HCl (Merck) (1:1 v/v) ilave edildikten sonra tüpler su banyosunda, 90 °C'de 2 saat bekletildi (109). Böylece tüplerdeki tüm dokunun homojenize olması sağlandı. Örnekler, oda sıcaklığında soğutulduktan sonra, önceden hazırlanmış, içinde 8 ml ultra saf su bulunan 15 ml'lik propilen tüplere aktarıldı. Böylece 15 ml'lik propilen tüplerde, içinde homojenize halde 150±10 mg endometriyal doku bulunan toplam 10 ml hacminde numuneler analiz için hazır hale getirildi.

3.2.3. Numunelerin Analiz İşlemi

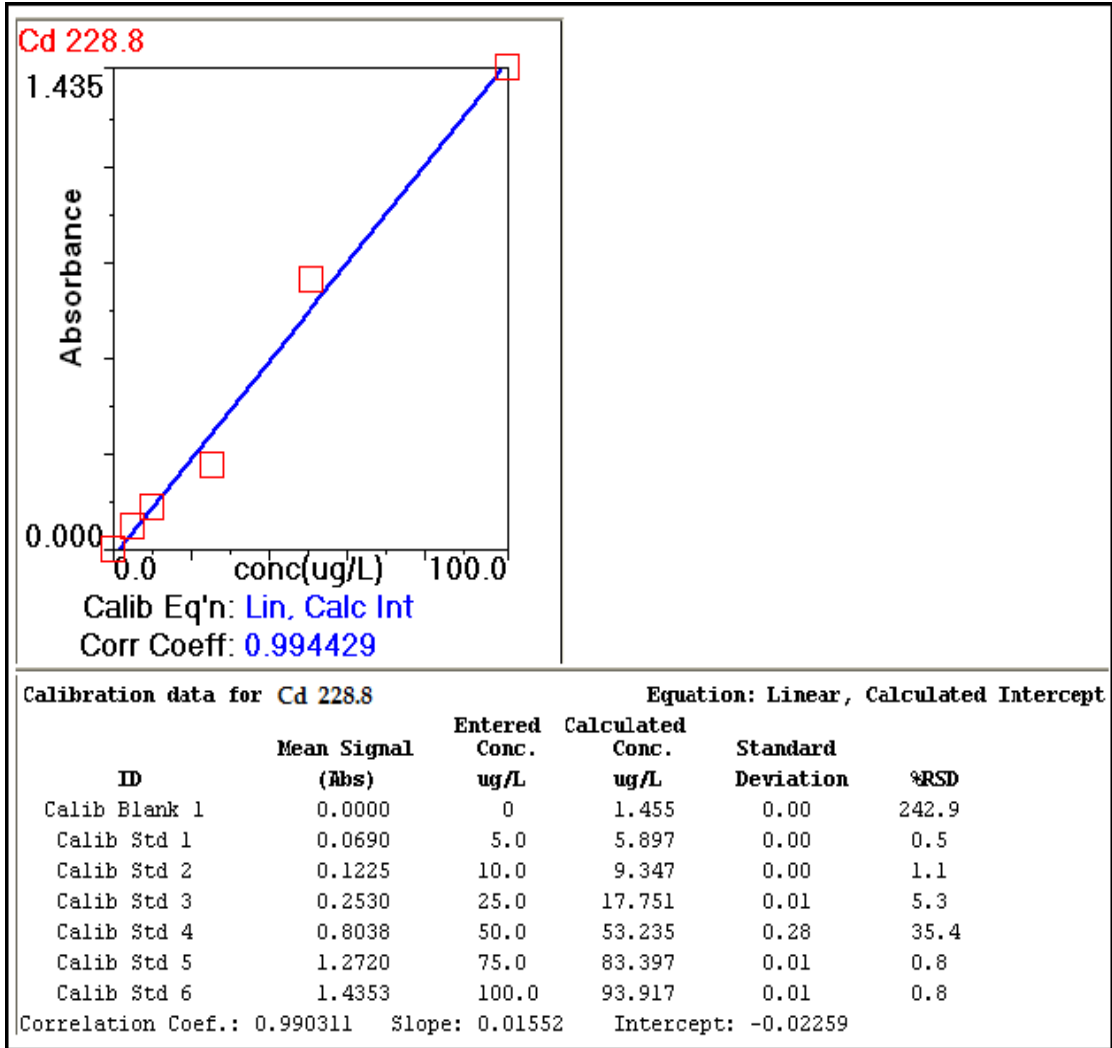
Ölçümler Atomik Absorbsiyon Spektrometresi (Perkin Elmer AAnalyst 800) cihazı ile yapıldı (Resim 3.1). Kurşun, kadmiyum, civa ve arsenik düzeyleri Grafit Fırın tekniği ile ölçüldü. Grafit Fırın Atomik Absorbsiyon Spektrometresinde yakma ortamında argon (200 ml/min) gazı kullanıldı.



Resim 3.1: Perkin Elmer AAnalyst 800 Atomik Absorbsiyon Spektrometresi.

3.2.3.1. Kadmiyum Analizi

Perkin Elmer AAnalyst 800 Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresinde kadmiyum hallow katod lambası takılıp lamba akımı 4 mA, dalga boyu 228.8 nm, slit 0.7L olarak ayarlandıktan sonra cihaz kalibrasyonuna geçildi. Cihaz kalibrasyonu $1000 \pm 3 \mu\text{g/ml}$ (%2 HNO_3 içinde Cd) (Custom-Grade) kadmiyum standart çözeltisinden hazırlanan farklı derişimlerdeki çözeltiler ile yapıldı (Şekil 3.1).

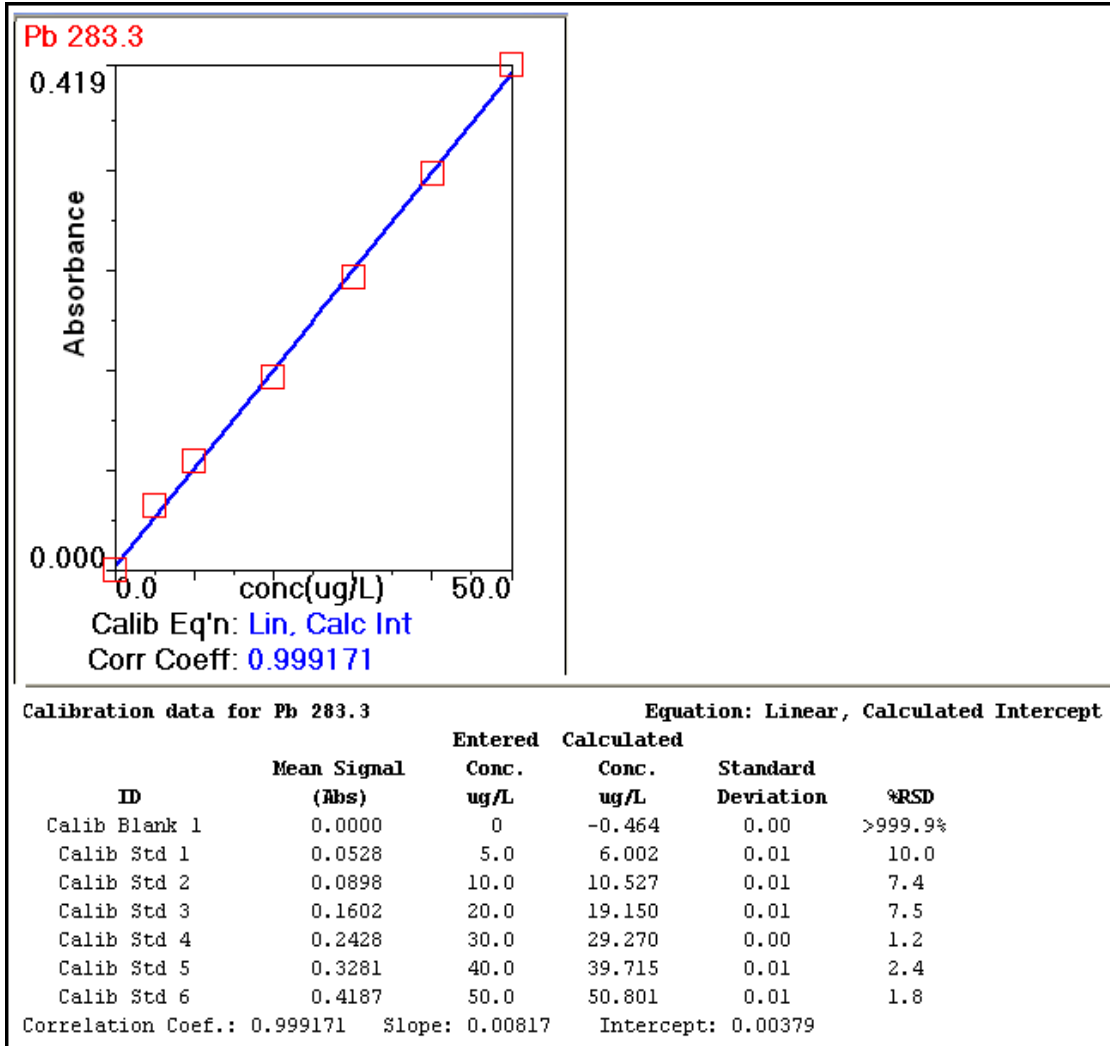


Şekil 3.1: Kadmiyum kalibrasyon grafiği

Hazırlanan çalışma standart çözeltileri ile cihaz kalibre edildikten sonra 5 ml'lik enjektör ile 1 ml numune alınıp 1.2 ml'lik Sample Cup Viallere dolduruldu. Ardından Sample Cup Vialler Autosampler'a yerleştirilerek cihaz çalıştırıldı. Çalışma cihazın grafit ünitesinde yapıldı. Cihaz her analiz için 20 μl örneği grafit fırın içine enjekte ederek tayini gerçekleştirdi. Her numune için 2 defa analiz yapıldıktan sonra bu iki analiz ortalaması yazıcıdan alındı.

3.2.3.2. Kurşun Analizi

Perkin Elmer AAnalyst 800 Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresinde kurşun hallow katod lambası takılıp lamba akımı 440 mA, dalga boyu 283.3 nm, slit 0.7L olarak ayarlandıktan sonra cihaz kalibrasyonuna geçildi. Cihaz kalibrasyonu $1003 \pm 2 \mu\text{g/ml}$ (%0,35 HNO₃ içinde Pb) (Custom-Grade) kurşun standart çözeltisinden hazırlanan farklı derişimlerdeki çözeltiler ile yapıldı (Şekil 3.2).

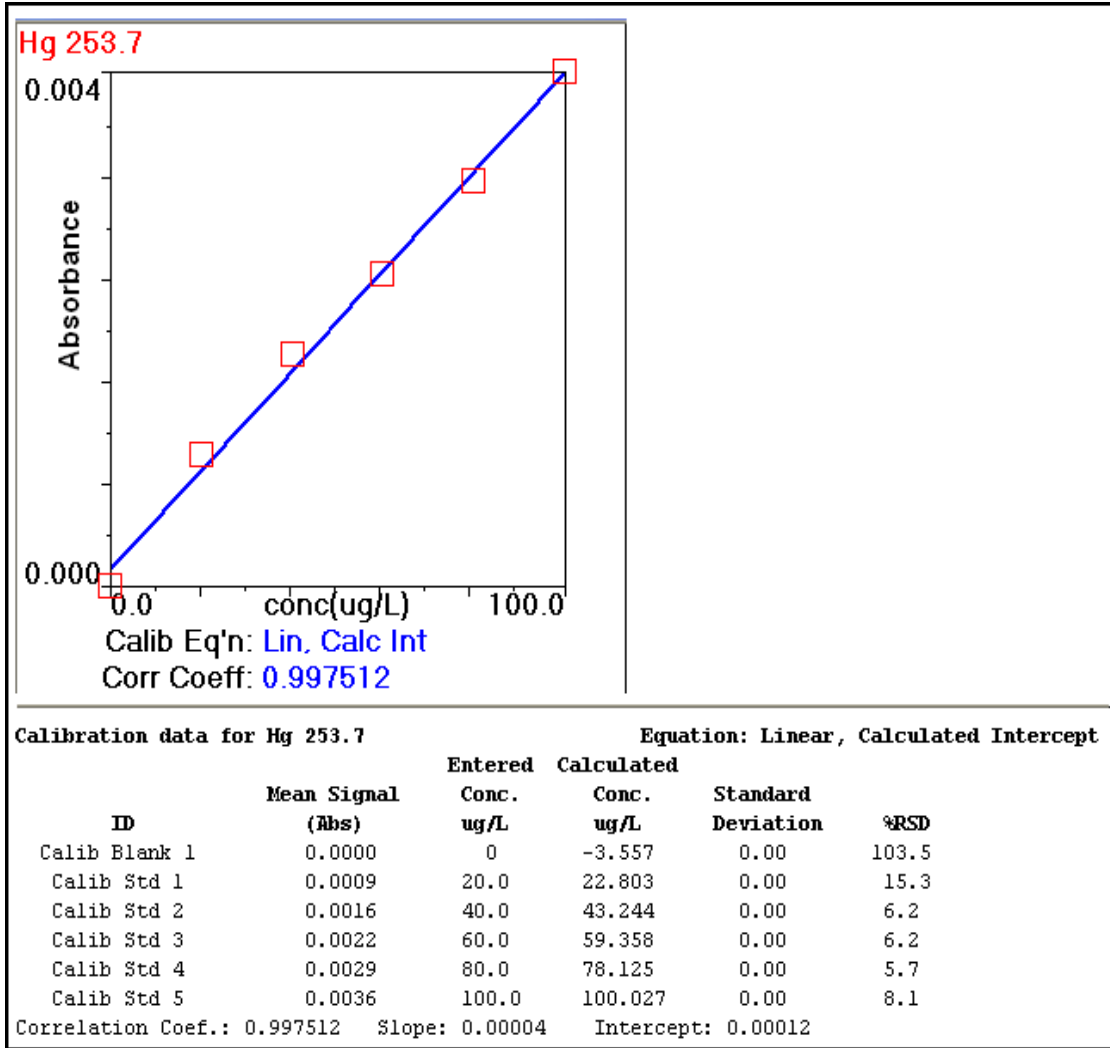


Şekil 3.2: Kurşun kalibrasyon grafiği

Hazırlanan çalışma standart çözeltileri ile cihaz kalibre edildikten sonra 5 ml'lik enjektör ile 1 ml numune alınıp 1.2 ml'lik Sample Cup Viallere dolduruldu. Ardından Sample Cup Vialler Autosampler'a yerleştirilerek cihaz çalıştırıldı. Çalışma cihazın grafit ünitesinde yapıldı. Cihaz her analiz için 20 µl örneği grafit fırın içine enjekte ederek tayini gerçekleştirdi. Her numune için 2 defa analiz yapıldıktan sonra bu iki analiz ortalaması yazıcıdan alındı.

3.2.3.3. Civa Analizi

Perkin Elmer AAnalyst 800 Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresinde kadmiyum hallow katod lambası takılıp lamba akımı 185 mA, dalga boyu 253.7 nm, slit 0.7L olarak ayarlandıktan sonra cihaz kalibrasyonuna geçildi. Cihaz kalibrasyonu $1007 \pm 3 \mu\text{g/ml}$ (%3,5 HNO₃ içinde Hg) (Custom-Grade) civa standart çözeltisinden hazırlanan farklı derişimlerdeki çözeltiler ile yapıldı (Şekil 3.3).

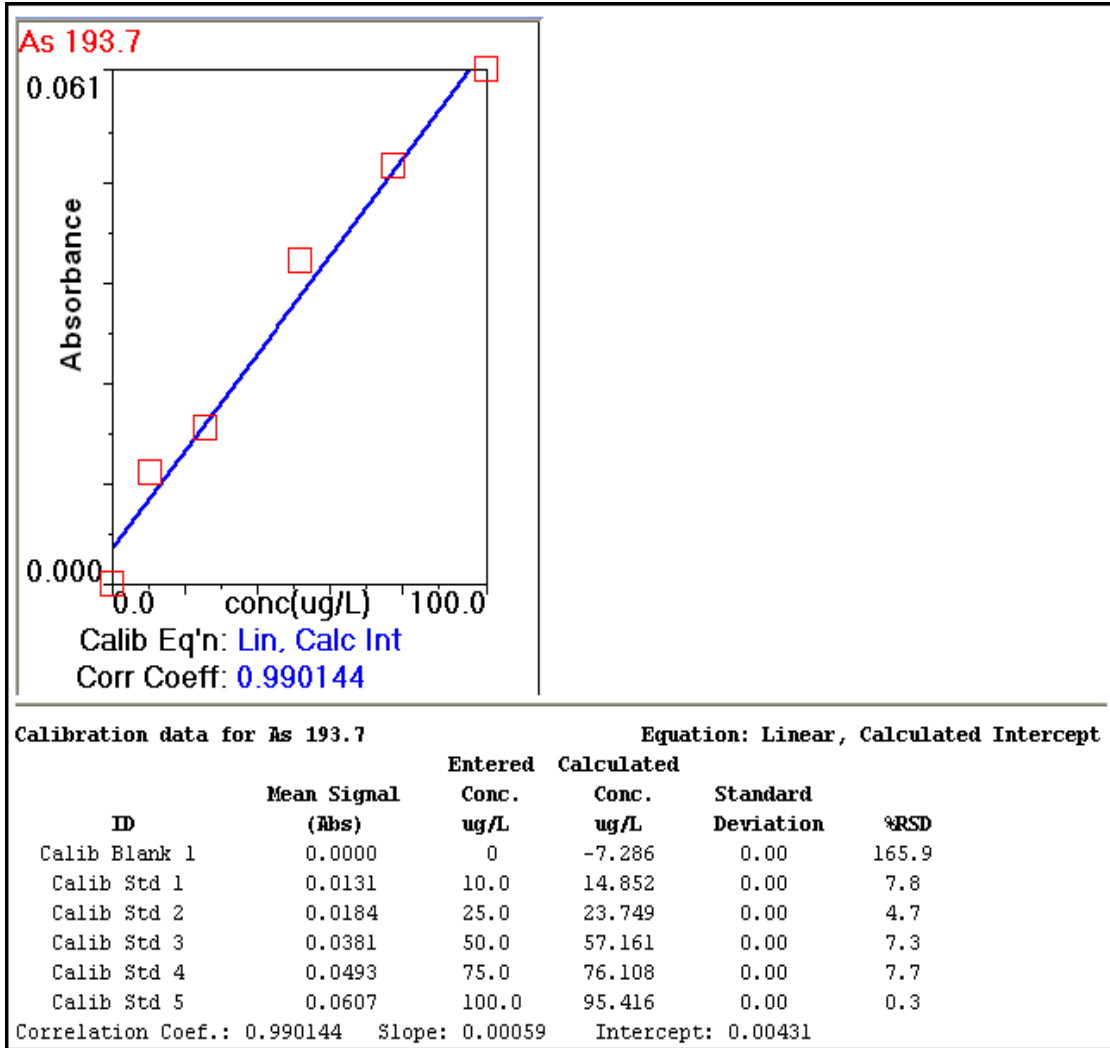


Şekil 3.3: Civa kalibrasyon grafiği

Hazırlanan çalışma standart çözeltileri ile cihaz kalibre edildikten sonra 5 ml'lik enjektör ile 1 ml numune alınıp 1.2 ml'lik Sample Cup Viallere dolduruldu. Ardından Sample Cup Vialler Autosampler'a yerleştirilerek cihaz çalıştırıldı. Çalışma cihazın grafit ünitesinde yapıldı. Cihaz her analiz için 20 μl örneği grafit fırın içine enjekte ederek tayini gerçekleştirdi. Her numune için 2 defa analiz yapıldıktan sonra bu iki analiz ortalaması yazıcıdan alındı.

3.2.3.4. Arsenik Analizi

Perkin Elmer AAnalyst 800 Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresinde kadmiyum hallow katod lambası takılıp lamba akımı 380 mA, dalga boyu 193.7 nm, slit 0.7L olarak ayarlandıktan sonra cihaz kalibrasyonuna geçildi. Cihaz kalibrasyonu $1014 \pm 3 \mu\text{g/ml}$ (%1,4 HNO₃ içinde As) (Custom-Grade) arsenik standart çözeltisinden hazırlanan farklı derişimlerdeki çözeltiler ile yapıldı (Şekil 3.4).



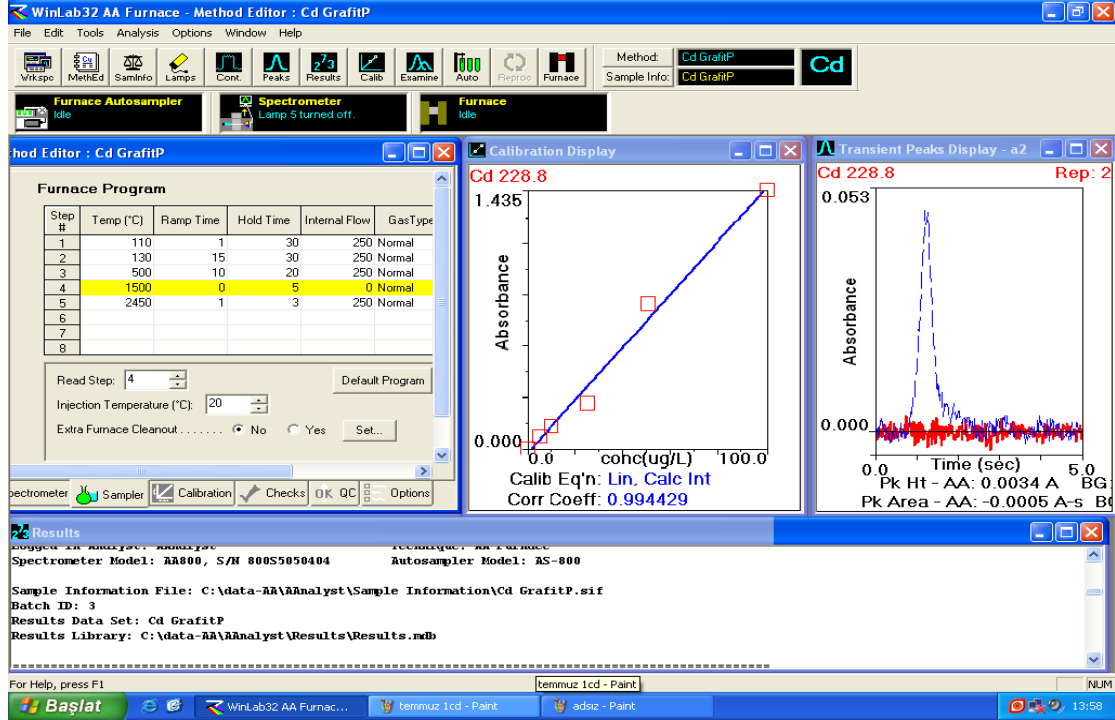
Şekil 3.4: Arsenik kalibrasyon grafiği

Hazırlanan çalışma standart çözeltileri ile cihaz kalibre edildikten sonra 5 ml'lik enjektör ile 1 ml numune alınıp 1.2 ml'lik Sample Cup Viallere dolduruldu. Ardından Sample Cup Vialler Autosampler'a yerleştirilerek cihaz çalıştırıldı. Çalışma cihazın grafit ünitesinde yapıldı. Cihaz her analiz için 20 μl örneği grafit fırın içine enjekte ederek tayini gerçekleştirdi. Her numune için 2 defa analiz yapıldıktan sonra bu iki analiz ortalaması yazıcıdan alındı.

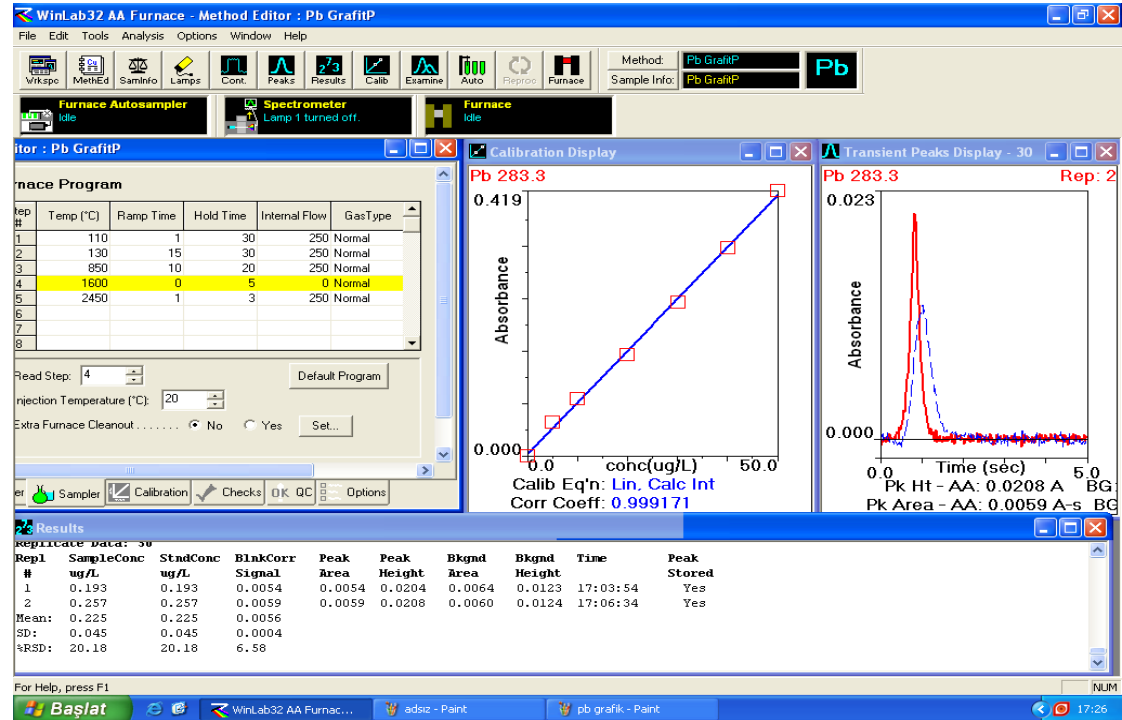
3.2.4. Grafit Fırın Sıcaklık Programları

Analizi yapılan ağır metallere ait grafit fırın sıcaklık programları aşağıdaki şekillerde verilmiştir.

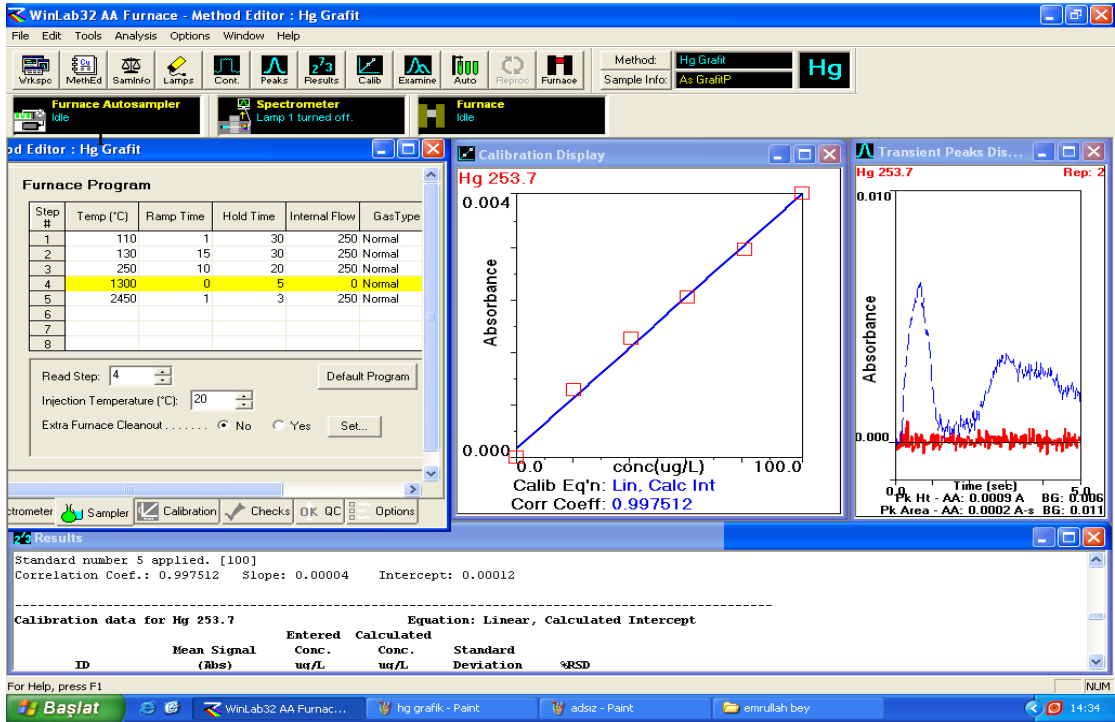
Şekil 3.5: Kadmiyum analizine ait grafit fırın sıcaklık programı



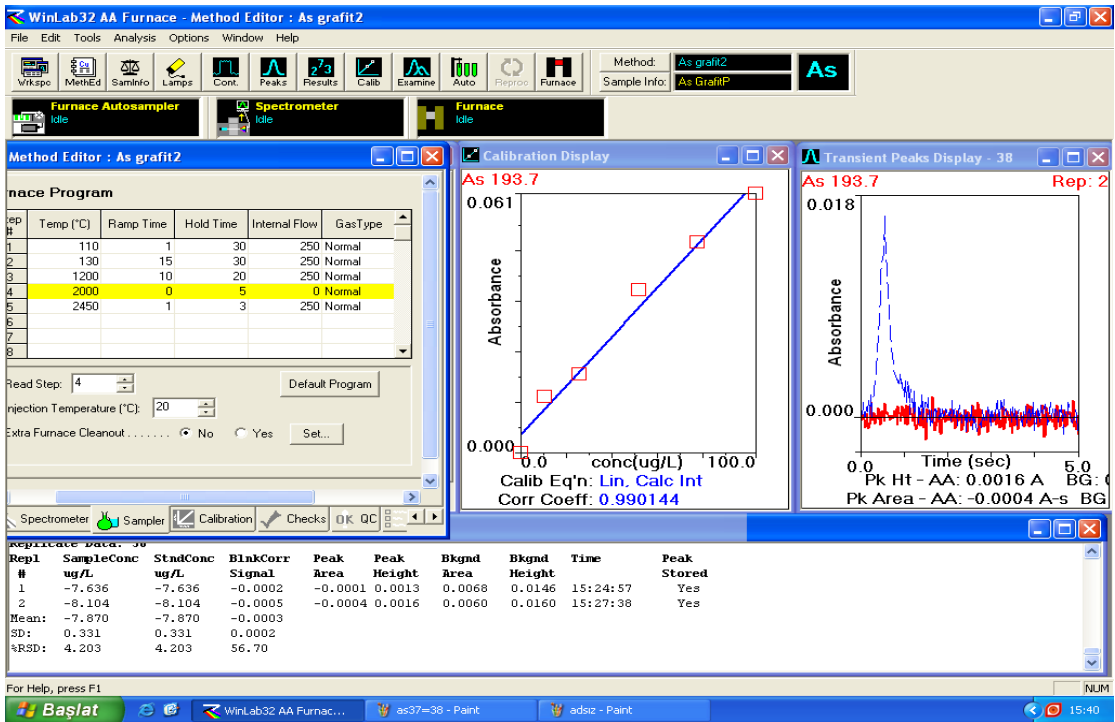
Şekil 3.6: Kurşun analizine ait grafit fırın sıcaklık programı



Şekil 3.7: Civa analizine ait grafit fırın sıcaklık programı



Şekil 3.8: Arsenik analizine ait grafit fırın sıcaklık programı



3.3. İstatistiksel Değerlendirme

Tüm veriler SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 11.0 paket programına kodlanarak girildi. Açıklanamayan infertil gruba ait veriler fertil kontrol grubuna ait veriler ile karşılaştırıldı. Ki-kare testi, Fisher kesinlik testi ve Yates düzetmeli Ki-kare testi kullanıldı. Parametrik verilerin karşılaştırılmasında Student's t-test, non-parametrik verilerin karşılaştırılmasında ise Mann Whitney U testi kullanıldı. $p \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Sosyodemografik özellikler karşılaştırıldığında, VKİ dışındaki tüm sosyodemografik özelliklerin her iki grupta da benzer olduğu bulundu (Tablo 4.1). İnfertil gruptaki olguların yaş ortalaması 29.95 (\pm 5.29) yıl, kontrol grubundaki olguların yaş ortalaması 31.17 (\pm 5.74) yıl olarak saptandı ($p=0.51$). VKİ infertil grupta 24.4 (\pm 1.9) iken kontrol grubunda 26.6 (\pm 3.4) idi ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0.03$). Kontrol grubundaki ofis memurluğu yapan bir olgu dışında, araştırmaya dahil edilen olguların tümü ev hanımıydı ($p=1.00$). Eğitim düzeyleri eğitim süresi (yıl) olarak; ≤ 5 yıl, > 5 yıl olmak üzere 2 alt grupta karşılaştırıldı. Eğitim süreleri açısından 2 grup arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.91$). Ailelerin ekonomik durumları aylık gelirleri şeklinde ve ≤ 900 Türk Lirası (TL), >900 TL olarak 2 alt gruba ayrılarak karşılaştırıldı (Türkiye İstatistik Kurumu'nun 2011 verilerine göre dört kişilik bir aile için açlık sınırı 899 TL), 2 grup arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.58$). Olgular yerleşim yeri açısından 'şehirde yaşayanlar' ve 'kırsal alanda yaşayanlar' olarak iki alt grupta karşılaştırıldı. Her iki grupta da vakaların büyük çoğu şehirde yaşıyordu; infertil grup 17/19 (%89.4), kontrol grubu 17/18 (%94.4). Bu anlamda iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p=1.00$).

Kendisi sigara içen olgular çalışma dışında bırakılmakla birlikte, infertil grupta eşi sigara içen 10/19 (%52) olgu varken, kontrol grubunda eşi sigara içen 10/18 (%55) olgu vardı, ancak iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.86$).

Tablo 4.1: Olguların sosyodemografik özellikleri

Karakteristikler	İnfertil	Fertil (Kontrol)	p
	n=19	n=18	
Yaş (yıl)*	29.95 (± 5.29)	31.17(±5.74)	0.51
Boy (m)*	1.61 (±0.7)	1.60 (±0.48)	0.61
Kilo (kg)*	63.5 (±7.7)	68.0 (±8.8)	0.11
VKI (kg/m ²)*	24.4 (±1.9)	26.6 (±3.4)	0.03
Meslek (Çalışan/Öğrenci)	0 (0%)	1 (5%)	1.00
Eğitim (yıl)			0.91
≤5	13 (%68.4)	12 (%66.6)	
>5	6 (%31.6)	6 (%33.4)	
Aile geliri (aylık / TL)			0.58
≤900	8 (%42.1)	6 (%33.3)	
>900	11 (%57.8)	12 (%66.7)	
Yerleşim yeri			1.00
Şehir	17 (%89.4)	17 (%94.4)	
Kır	2 (%10.6)	1 (%5.6)	
Sigara	0	0/18	
Sigara (eş)	10 (%52)	10 (%55)	0.86

* Değerler ortalama ve standart sapmaları ile birlikte verilmiştir.

İlginç olarak, infertil gruptaki tüm olguların endometriyal dokusunda kadmiyum saptanmış olmasına karşın kontrol grubunda sadece 6 olguda kadmiyum saptandı (Tablo 4.2). İnfertil gruptaki endometriyal dokuda ortalama kadmiyum düzeyi 32.09 µg/l (±13.1) (aralık: 16.92-61.52) olarak saptanırken, kontrol grubunda 3.51 µg/l (±6.02) (aralık: 0.00-16.39) olarak saptandı ve aradaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulundu (p=0.0001) (Tablo 4.2). İnfertil hastaların endometriyal dokularında kadmiyum bulunma olasılığı, fertil bireylerin endometriyal dokularında kadmiyum bulunma olasılığına göre 3 kat artmış bulundu (p=0.001). Kontrol grubunda kadmiyum tespit edilen vakalar arasında en yüksek kadmiyum düzeyi 16.39 µg/l bulunurken, infertil vakalar arasında en düşük kadmiyum düzeyi 16.92 µg/l olarak bulundu (Tablo 4.3).

İnfertil gruptan 19 olgudan 5'inde, kontrol grubundan 18 olgudan ise sadece 1'inde kurşun saptandı (Tablo 4.2). Her ne kadar infertil hastaların %26'sının endometriyal dokusunda kurşun saptanmış olsa da infertil hastaların endometriyal dokularında kurşun bulunma olasılığı ile fertil bireylerin endometriyal dokularında kurşun bulunma olasılığı arasında anlamlı bir fark bulunmadı (p=0.18). İnfertil gruptaki bu 5 olguda 150 mg endometriyal dokuda 0.12 µg/l, 0.12 µg/l, 0.24 µg/l, 0.29 µg/l ve 0.32 µg/l kurşun saptanmasına karşılık, kontrol grubundaki tek hastanın endometriyum dokusundaki, 150 mg doku başına kurşun düzeyi 0.03 µg/l olarak saptandı. Bu biçimiyle bakıldığında bu 5 olgudaki ortalama kurşun düzeyi (0.21 µg/l) ile kontrol grubundaki tek olgunun kurşun düzeyi (0.03 µg/l) arasında anlamlı bir fark var gibi görünse de, grup ortalamaları; infertil grupta 0.057 µg/l (±0.10) (aralık: 0.00-0.32), kontrol grubunda 0.0017 µg/l (±0.07) (aralık: 0.00-0.03) olarak saptandı ve iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmadı (p=0.07).

Tablo 4.2: Analizi yapılan ağır metalin türü ve olgu sayıları

Ağır metal	İnfertil	Fertil (Kontrol)	Relatif Risk (%95 Güven Aralığı)	p
	n=19	n=18		
Kadmiyum	19 (%100)	6 (%33.3)	3.00 (1.6-5.8)	0.001
Kurşun	5 (%26.3)	1 (%5.5)	6.07 (0.6-58.2)	0.18
Arsenik	0	0	-	-
Civa	0	0	-	-

Tablo 4.3: Kadmiyum ve kurşun düzeylerinin iki grup arasında karşılaştırılması

Ağır Metal	İnfertil	Fertil (Kontrol)	p
	n=19	n=18	
Kadmiyum (µg/l)	32.09 (±13.1) (16.92-61.52)	3.51 (±6.02) (0.00-16.39)	0.0001
Kurşun (µg/l)	0.057 (±0.10) (0.00-0.32)	0.0017(±0.07) (0.00-0.03)	0.07

Değerler ortalama ve standart sapmaları ile birlikte verilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen 37 olgunun (19'u infertil, 18'i fertil kontrol) hiçbirinde civa ve arsenik saptanmadı.

5. TARTIŞMA

Sağlıklı bir gebeliğin başlaması için ovüle olmuş matür bir oosit, normal sperm üretimi, sağlıklı ve reseptif bir endometriyum gerekmektedir. İlave olarak sperm ve oositin üreme kanalında karşılaşması spermin oositi döllemesi, sonrasında oluşan gebelik mahsulünün uterin kaviteye taşınması ve önceden hazırlanmış olan sağlıklı endometriyuma tutunması gerekmektedir. Bu karmaşık zincirin herhangi bir halkasında bir anormallik olması bu doğal süreci sekteye uğratarak ve infertiliteye neden olabilir. Ağır metallerin insan üreme sistemi üzerine olumsuz etkilerinin olduğu bilinmektedir (110-112). Ağır metaller, hormonal düzensizliğe neden olarak, sperm üretiminde anormalliğe neden olabileceği gibi ovulasyonu ve gebeliği de önleyebilir (113-115).

5.1. Kadmiyum

Çevresel kadmiyum kirliliği olan bölgelerde yaşayan kadınlarda sterilitenin 5 kat arttığı rapor edilmiştir (116). Ancak riskin, maruziyet süresi ve ağır metal konsantrasyon düzeyi ile doğrudan ilişkili olduğu düşünülmektedir (117, 118). Toplumda kadmiyum maruziyetinin temel nedeni kontamine hava, su ve yiyeceklerdir (119). Bununla birlikte mesleksi maruziyet ve sigara da önemli maruziyet nedenleri arasında yer almaktadır (120, 121). Bu açıdan incelendiğinde, bizim çalışmaya dahil edilen olguların hiç biri kadmiyuma maruz kalacak bir işte çalışmıyordu ve hiçbir olgu sigara içmiyordu. Eşlerin sigara içim oranı da iki grup arasında benzerdi. Bu olgularda kadmiyumun muhtemel kaynağı kontamine yiyecekler, içme suyu, kozmetikler ve endüstriyel kirlenme olabilir (18).

Toplumda kadmiyumun üreme sağlığı üzerine etkisini araştıran çalışmalar sınırlı sayıda, nispeten eski çalışmalar olup, çoğu erkekler üzerinde yapılan çalışmalardır. Yakın zamanda, erkekler üzerinde yapılan iki çalışmada kan ağır metal düzeylerinin, üreme sistemi dokularındaki ağır metal konsantrasyonlarını yansıtmadığı gösterilmiştir (18, 122). Bizim çalışmamızda vakaların kan ağır metal düzeylerinden ziyade ağır metallerin açıklanamayan infertilite etyolojisinde olası rolleri araştırıldığından, bu olası etyolojik faktörün hedef dokusu olma potansiyeli olan endometriyumda ağır metal düzeyi bakılmıştır.

İnsanlarda kadmiyumun fizyolojik konsantrasyonları, yaş ve sigara içimi ile artmakla birlikte, kanda 2.9 ± 2.5 µg/l, seminal plazmada 0.19 ± 0.2 µg/l ve foliküler sıvıda 6.73 ± 0.31 µg/l olarak tespit edilmiştir (123). Sigara içenlerde bu rakamlar iki katına çıkabilir (124). Bununla birlikte birçok çalışmada $10-30$ µM konsantrasyonlardaki kadmiyumun hücre için toksik olabileceği, hatta hücre ölümüne yol açabileceği gösterilmiştir (125-127).

Bizim çalışmamızda açıklanamayan infertilite olgularından alınan 150 ± 10 mg'lık endometriyal dokudaki kadmiyum konsantrasyonu 32.09 ± 13.1 µg/l olarak saptanırken, kontrol grubunda 150 ± 10 mg'lık endometriyal dokudaki kadmiyum konsantrasyonu 3.51 ± 6.02 µg/l olarak bulunmuş ve aradaki fark istatistiksel açıdan anlamlı olarak değerlendirilmiştir. Literatürde insan endometriyumunda fizyolojik kadmiyum konsantrasyonuna ilişkin herhangi bir veriye rastlamamakla birlikte, bu çalışmada sağlıklı-fertil kontrol grubunda sadece 6/18 olgunun endometriyumunda kadmiyum saptanmış ve bu grupta kadmiyum konsantrasyonu 150 mg'lık doku başına 3.51 ± 6.02 µg/l olarak hesaplanmıştır.

Görüldüğü gibi hasta grubunun endometriyumunda elde edilen 32.09 ± 13.1 µg/l'lik kadmiyum konsantrasyonu, doku farkı gözetmeksizin, literatürdeki fizyolojik konsantrasyonlardan daha yüksek bulunmuştur. Dolayısıyla bu konsantrasyondaki kadmiyumun endometriyal hücreler (dolayısıyla endometriyal reseptivite) üzerine, uterin kaviteden geçen sperm üzerine ve implantasyona hazırlanmış blastokist üzerine toksik etkileri olabilir. Nitekim, kadmiyumun in-vitro olarak, oosit maturasyonu, canlı sperm ve fertilizasyon oranlarını azalttığı, hatta yüksek dozlarda (20 µM) oositler için öldürücü (dejenerasyon yaparak) etki gösterdiği ve sperm membran bütünlüğünü bozarak akrozom reaksiyonunu başlattığı gösterilmiştir (123). Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, seminifer tüplerde kadmiyum varlığının spermatogoniya, spermatozoid ve spermatozoidlerde nekroza yol açtığı gösterilmiştir (128).

Kadmiyumun fertilite üzerine olası zararlı etkilerini araştıran çalışmaların çoğu in-vitro veya hayvan çalışmalarıdır. İnsan endometriyum dokusu üzerine yapılan sınırlı sayıdaki in-vitro çalışmalarda, veriler tartışmalı olsa da, kadmiyumun steroid hormon sentezini etkileyebileceği gösterilmiştir (124, 129-132). Jolibois ve ark. (131) term plasentalardan alınan trofoblast hücrelerinin in-vitro olarak kadmiyuma maruz bırakılması durumunda, etki mekanizması bilinmemekle birlikte, progesteron sentezini

azaltabileceğini göstermiştir. Buna karşın Piasek ve ark. (129) ise, yaptıkları deneysel bir çalışmada, kadmiyum maruziyetinin gebelik süreci boyunca progesteron düzeylerinde bir değişikliğe neden olmadığını rapor etmiştir. İlginç olarak, aynı çalışmada, östradiol düzeylerinin ise anlamlı biçimde azaldığı gösterilmiştir. Ancak kadmiyumun, steroid hormon sentezini hangi mekanizmayla bozduğu tam olarak bilinmemektedir.

Gonadal hücrelerde progesteron sentezinde, kolesterolün mitokondri içine alınmasına aracılık eden steroidojenik akut regülatuar protein (StAR) ve mitokondri içindeki kolesterolün, yan zincirini kırarak, pregnenolona dönüşümünü sağlayan sitokrom p450 scc (side chain cleavage) hız kısıtlayıcı enzimlerdir. Kadmiyumun bu iki enzimi inhibe ederek ovaryan granüler hücrelerde progesteron sentezini azalttığı gösterilmiştir (132). Plasental progesteron sentezi için hız kısıtlayıcı basamak ise spesifik sinsityotroblastik reseptörler tarafından düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) uptake basamağıdır. Fonksiyonel ve yapısal olarak LDL reseptörleri kadmiyum için hedef hücreler olabilir, çünkü bu reseptörler sistein açısından zengin hücrelerdir ve kadmiyumun sisteine affinitesi vardır (130). Başka çalışmalarda kadmiyumun trofoblast hücrelerinde lizozomal vezikülasyon, nükleer kromatin kümelenmesi, nükleolar değişiklikler ve mitokondriyal kalsifikasyona neden olarak normal hücre yapısını bozduğu göstermiştir (133). Ayrıca, kadmiyumun lipid peroksidasyonuna neden olduğu ve bunun sonucunda intrasellüler organellerin membran bütünlüğünde bozulma ve organellerde fonksiyon kaybı oluşturduğu da gösterilmiştir (123).

Konu hala tartışmalı olsa da, bazı çalışmalarda kadmiyumun ER'lere yarışmasız (non-kompetitif) bağlanarak östradiolün reseptörlerine bağlanmasını bloke ettiği gösterilmiştir (134). Bazı çalışmalarda ise kadmiyumun östradiol-ER bağlanmasını bloke etmediği, östradiol reseptörlerinin transkripsiyon aktivitesini etkileyerek birçok östrojen sinyal yolağını bozmak suretiyle önemli bir endokrin bozukluğa neden olduğu rapor edilmiştir (135).

Steroid hormon sentezi ve steroid hormon reseptörleri üzerine bir takım olumsuz etkileri olduğu gösterilmiş olan kadmiyumun, bu etkiyle genel olarak üreme sağlığı üzerine, özellikle de fertilizasyon ve implantasyon aşamalarına olumsuz etkilerinin olması kaçınılmaz görünmektedir.

Seminal plazma kadmiyum seviyeleri ile semen parametreleri arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalarda birbiriyle çelişen pek çok bulgu vardır; seminal plazma kadmiyum seviyelerinin semen parametreleri ve fertilitite durumu ile ilişkisinin olduğunu bildiren çalışmalar olduğu gibi, herhangi bir ilişkisinin olmadığını bildiren çalışmalar da mevcuttur (18, 136-138).

Benoff ve ark. 2009'da (18) yaptıkları bir çalışmada, infertil erkek olgularda seminal plazma kadmiyum seviyelerinin semen parametreleriyle ters korelasyon gösterdiğini ortaya koymuştur. Aynı çalışmada seminal plazma kadmiyum seviyelerinin özellikle infertil hastalarda yüksek olduğu ve azalan sperm kalitesiyle ilişkili olduğu da gösterilmiştir. Ayrıca, Lenoi'ye (123) göre lipid peroksidasyonu sonucu organellerde meydana gelen fonksiyon kaybı kadmiyuma maruz kalan spermelerin canlılıklarını yitirme mekanizmasını açıklayabilir. Zona pellusidaya bağlanmak için spermın işlevsel bütünlüğü gerekli olup bunun için akrozomun korunması gereklidir (139). Ekzositoz agonistlerinin neden olduğu, ekstrasellüler alandan kalsiyum akımının akrozomal zarın ekzositozu için itici bir güç olduğu varsayılmaktadır. Kalsiyum bağlama alanları için intrasellüler kalsiyum ile yarışan yüksek seviyede kadmiyum akrozom zarında prematür ekzositoza yol açabilir, bu da kadmiyumun fertilizasyon oranlarına etkisini açıklayabilir (123). Bizim çalışmamıza dahil edilen açıklanamayan infertilite olgularının endometriyumundaki yüksek kadmiyum konsantrasyonu, uterin kaviteden geçen spermelerde prematür akrozom reaksiyonuna neden olarak bu mekanizmayla infertiliteye yol açabilir.

Birçok çalışmada 10-30 μ M konsantrasyonlardaki kadmiyumun hücre ölümüne yol açabileceği gösterilmiştir (125-127). Bu etki, lipid peroksidasyonunda artışa, reaktif oksijen radikallerinin (ROR) artmasına ve aynı zamanda katalaz, glutatyon ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan sistemlerde de azalmaya bağlanmıştır (140). ROR'ları hem canlı hücrelerdeki mitokondriyal solunum zinciri gibi biyokimyasal olaylar hem de dış faktörler sonucu üretilir (141). Oksidatif stres lipid peroksidasyonunu uyarır, fonksiyonel ve yapısal olarak protein ve DNA'da değişikliklere ve apoptozise neden olur (142). Hayvan modeli ve klinik çalışmalardan elde edilen veriler oksidatif stresin hem erkek hem de kadının üreme sağlığını olumsuz etkileyen bir etyolojik faktör olduğunu göstermektedir (143-146). ROR'ların neden olduğu sperm ile ilişkili bozukluklar; sayı ve motilite azalması ve sperm-oosit birleşmesinin inhibisyonudur (143). Ayrıca, oksidan-antioksidan dengesinin bozulması

durumunda folikülogenez, spermatogenez, fertilizasyon ve implantasyon süreçlerinde aksama meydana gelebileceği gösterilmiştir (141).

Ooforektomize hayvanlar üzerinde yapılan bir çalışmada kadmiyumun uterus ve meme dokusunda ER'leri üzerinden östrojenik etkilerinin olduğu ve uterus ağırlığında artışa neden oldukları rapor edilmiştir. Uterus ağırlığındaki bu artışın toksisiteye değil, kadmiyumun mitojenik etkisine bağlı olduğu öne sürülmüş ve kadmiyumun in-vivo olarak güçlü bir nonsteroidal östrojen olduğuna kanaat getirilmiştir (124).

Massányi ve ark.'nın (147), kadmiyumun over, tuba uterina ve uterus üzerine etkisini araştıran, ratlarda yapılan deneysel bir çalışmada ise kadmiyumun bu organlarda nükleer kromatin dağılması, endoplazmik retikulum ve perinükleer aralıkta genişleme gibi hücresel düzeyde olumsuz bir takım değişikliklere neden olduğu, ayrıca damar duvar yapısında bozulmaya neden olarak ovaryan ve uterin stromada ve tuba uterina dokusunda ödeme yol açtığı gösterilmiştir. Bunların yanı sıra aynı çalışmada kadmiyum verilen ratlarda, kontrol grubuna göre, gelişmiş folikül hacminin göreceli küçük olduğu ve atretik folikül sayısında anlamlı biçimde artış olduğu saptanmıştır.

Ooforektomize hayvan çalışmalarında kadmiyumun, muhtemelen inflamasyona yol açarak, östrojenden farklı bir mekanizmayla etki ettiği öne sürülmüştür. 17 β -östradiol verilen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, kadmiyumun doz bağımlı olarak (0.8 mg/kg/gün; çalışmadaki en yüksek dozda) östradiole benzer biçimde ancak daha az miktarda; uterus ağırlığında artış, epitelyum hücrelerinde nükleus/sitoplazma oranında azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (132, 148). Ancak östrojenden farklı olarak kadmiyumun, luminal epitelyum hücrelerinin yüksekliklerinde ve endometriyal bezlerin sayısında bir artışa neden olmadığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada her iki grupta da kontrol grubuna göre anlamlı biçimde endometriyal kalınlıkta artış saptanmış olmakla birlikte, östradiol verilen grupta uterin kavite yüzeyinde çok sayıda epitel sütunlarının olduğu ve bu nedenle kavitenin inişli-çıkışlı bir görünümde olduğu gösterilmiştir. Ancak kadmiyum verilen grupta endometriyumda atrofik ve düz bir görünüm olduğu ve yüzeyin hiyalin hücrelerle düşenmiş olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte kadmiyum alan grupta endometriyal bezlerin sayısında anlamlı bir azalma olduğu da rapor edilmiştir (148). Endometriyal reseptivite ve embriyo implantasyonunda rol alan karmaşık moleküler mekanizmalar göz önüne alındığında,

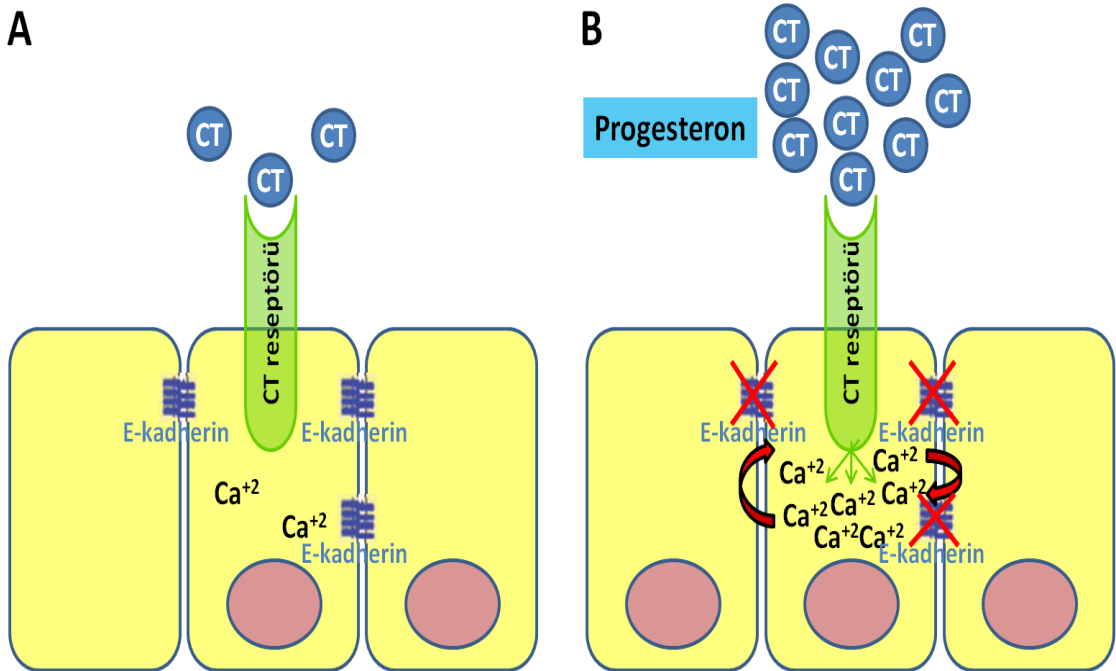
kadmiyumun neden olduğu bu şekildeki endometriyal değişikliklerin reseptiviteyi ve implantasyon sürecini olumsuz etkilemesi kaçınılmaz görünmektedir.

Çalışmalarda, kadınlardaki ortalama kan kadmiyum düzeyinin erkeklerinkinden daha fazla olduğu gösterilmiş ve bu farkın menstrüasyon nedeniyle demir depolarının azalması ve demir bağlama kapasitesinin artması sonucunda olduğu savunulmuştur (149). Genetik faktörlere bağlı olarak kan kadmiyum konsantrasyonlarında, erkelerde %13, kadınlarda %65'e varan değişiklikler olabileceği rapor edilmiştir (150). Spesifik genlerdeki mutasyonların kadmiyumun bazı infertil erkeklerin reproduktif organlarında birikmesine katkıda bulunabileceği bildirilmiştir (151, 152). Kadmiyumun voltaj bağımlı kalsiyum kanalları, intestinal iki değerlikli metal taşıyıcı ve demir taşıyıcıyı da kapsayan iyon taşıyıcıları yoluyla hücre içine girdiğine (18, 153) göre bu iyon kanallarındaki mutasyonlar kadmiyumun dokudaki birikimini açıklayabilir. Bizim çalışmamızdaki açıklanamayan infertilite olgularının endometriyumundaki yüksek kadmiyum seviyelerinden aynı mekanizmanın sorumlu olması olasıdır.

Desidulizasyon, yani endometriyal stromal farklılaşma, gelişmekte olan blastosist implantasyonu için vazgeçilmezdir (154). İnsan endometriyal stromal hücrelerin desidulizasyonu adet döngüsünün geç sekretuar fazında oluşur ve morfolojik ve fonksiyonel farklılaşma ile karakterizedir. Desidulizasyon gerçekleştiğinde, desidual endometrial stromal hücreleri serbest prolaktin ve IGFBP-1 salgılar (155). Tsutsumi ve ark. (154) kadmiyumun insan endometriyumu üzerindeki etkisini araştırmak için in-vitro desidulizasyon modeli oluşturarak deneyler yapmıştır. Şaşırtıcı bir biçimde bu modelde kadmiyum, desidualizasyonun bir göstegesini olan prolaktinin seviyesini artırmıştır. İlave olarak, kadmiyuma maruz bırakılan endometriyal stromal hücrelerde Prolaktin mRNA'nın up-regüle olduğu görülmüştür. Bu veri, desidualizasyonun transkripsiyonel olarak kadmiyum tarafından kontrol edildiğini düşündürmektedir. Aynı çalışmada östrojenin progesteron mRNA ekspresyonunu arttırdığı, ancak kadmiyumun progesteron mRNA ekspresyonunu değiştirmedeği gözlenmiş ve sonuç olarak kadmiyumun desidualizasyonu progesteron üzerinden değil bilinmeyen başka bir mekanizmayla yaptığı düşünölmüştür. Endometrial stromal hücrelerinin desidualizasyon zamanlaması başarılı bir implantasyon için önemlidir ancak, bu çalışmanın önemli handikapları var; birincisi çalışmaya dahil edilen olgular 41-49 yaşları arasında, ikincisi, her ne kadar yazar

sonuca etki etmeyeceğini savunsa da, örnekler alınırken siklus zamanı dikkate alınmamıştır. Yine de bu çalışmada gösterildiği gibi, eğer kadmiyum endometriyal stromal hücrelerde, implantasyon için uygun olmayan bir zamanda, desidulizasyonu başlatırsa bu durum implantasyon başarısızlığına yol açabilir.

Embriyo implantasyonu üzerine yapılan fare çalışmalarında, E-kadherin mRNA düzeyinin luteal fazda anlamlı biçimde daha yüksek olduğu (156) ve E-kadherin genindeki mutasyonların defektif preimplantasyonel gelişim ile sonuçlanabileceği gösterilmiştir (157). E-kadherinin insan embriyo implantasyonundaki rolü bilinmemektedir, fakat bu ekspresyon paternine bakılarak bu süreçte önemli rolleri olabileceği söylenebilir (58). E-kadherin Ca^{+2} bağımlı bir hücre-hücre adezyon molekülüdür (Şekil 5.1). E-kadherin, epiteliyal plazma membranlarının yan taraflarındaki özel bölgelerdeki yapışma noktalarına yerleşmiştir ve epiteliyal hücrelerdeki bu birleşmelerin kurulması ve desteklenmesi için kritik bir rolü olduğuna inanılmaktadır (158, 159). Hücre-hücre adezyon disfonksiyonundan sorumlu ana moleküler olaylardan birinin de E-kadherin ekspresyonunun baskılanması olduğu düşünülmektedir (58). Nitekim, köpeklerde yapılan bir çalışmada kadmiyumun tek tabakalı renal hücrelerinde, E-kadherin kaybına neden olarak hücrelerin birbirinde ayrılmasına sebebiyet verdiği gözlenmiştir (160).



Şekil 5.1: E-Kadherin ile kalsiyumun ilişkisi. A. İntrasellüler Ca^{+2} tarafından kontrol edilen E-kadherin ile epiteliyal hücre adezyonu. B. Progesteron seviyesinin artması kalsitonin (CT) ekspresyonunu artırır ve böylece intrasellüler Ca^{+2} konsantrasyonu artar, daha sonra bu Ca^{+2} hücrelerin temas alanlarında E-kadherin ekspresyonunu baskılar (58).

Ağır metal iyonlarının birçok tipte hücrenin membranındaki Ca^{+2} kanallarına bağlanabilme özelliğine sahip olduğu gösterilmiştir (160). Kadmiyumun da, protein bağlama alanları için kalsiyum ile yarıştığı ve böylece intrasellüler kalsiyum aktivitesini etkilediği, ayrıca kalsiyum kanallarından geçerek sitozolik kalsiyum-bağımlı hücresel aktivitelerde değişikliğe neden olduğu rapor edilmiştir (161). Öyleyse açıklanamayan infertil hastaların endometriyumundaki kadmiyum, Ca^{+2} iyonlarının yerine geçerek E-kadherin fonksiyonunda defekte yol açmak suretiyle implantasyon sürecini sekteye uğratabilir.

Şu ana kadar yapılan çalışmaların verileri dikkate alındığında (Tablo 5.1), endometriyal dokudaki kadmiyumun; kaviteden geçen spermelerin canlılık, motilite ve akrozom reaksiyonunu olumsuz etkileyerek fertilizasyon, endometriyal reseptivite ve implantasyon süreçlerinde aksaklıklara yol açabileceği ve bu nedenle açıklanamayan infertilitenin etyolojisinde olası nedenler arasında sayılması gerektiği savunulabilir.

Tablo 5.1: Kadmiyumun üreme sağlığı üzerine olası etkileri

Etkinin oluştuğu yer	Olası etki mekanizması	Referanslar
Üreme sistemi hormonları	- Steroid hormon sentezinde aksaklık - Reseptör düzeyinde olumsuz etki	124, 129-132
Sperm	- Lipid peroksidasyonu nedeniyle intrasellüler membran bütünlüğünde bozulma ve organellerde fonksiyon kaybı - Erken (prematür) akrozom reaksiyonu - Reaktif oksijen radikallerinin üretiminde artış nedeniyle spermiyogenezde bozulma ve spermelerin sayısı ve motilitesinde azalma - Spermatogoniya, spermatosit ve spermatidlerde nekroz	123, 128, 143
Over	- Lipid peroksidasyonu nedeniyle intrasellüler membran bütünlüğünde bozulma ve organellerde fonksiyon kaybı - Oksidan-antioksidan dengesinin bozulması sonucu foliküler atrezide artış, folikülogenez ve oosit maturasyonunda aksaklık - Reaktif oksijen radikallerinin üretimindeki artış nedeniyle sperm-oosit birleşmesinin inhibisyonu	123, 141, 147
Endometriyum	- Hücresel etki ile endometriyal bezlerin gelişiminde defekt, epiteliyal hücrelerin gelişiminde aksama ve implantasyon için elverişsiz endometriyal yüzey - Oksidan-antioksidan dengesinin bozulması sonucu implantasyon sürecinde aksama - Erken desidualizasyon - Ca^{+2} iyonlarının yerine geçerek E-kadherin gibi hücre adezyon moleküllerinin fonksiyonunda bozulma	148, 154, 160

5.2. Kurşun

Kurşunun reproduktif toksin olarak geniş bir geçmişi vardır (162). Hem epidemiyolojik hem de hayvanlar üzerinde yapılan araştırmaların deneysel verileri, farklı konsantrasyonlarda kurşunun erkek üreme sistemi üzerine geniş bir toksisite spektrumuna sahip olduğunu göstermiştir; kurşun spermatogenezisi, spermin fonksiyonel parametrelerini ve üreme hormonlarını olumsuz etkileyebilir. Hayvan çalışmalarında kurşun maruziyetinin, anormal sperm fonksiyonlarıyla, özellikle prematür akrozom kırıklarıyla ilişkili olduğu bulunmuştur (163, 164).

Kurşun maruziyetinin istenmeyen etkileri genellikle yüksek seviyelerde ortaya çıkar (101). Buna karşın, erkek üreme sistemi üzerinde, uzun süreli düşük doz maruziyetin de kısa süreli ancak yüksek doz kurşun maruziyeti ile benzer etkilere neden olabilmektedir (17). Ayrıca maruziyetin süresi ve dozunun yanı sıra kişisel farklılıklar, sosyo-ekonomik durum ve çeşitli çevresel faktörler de maruziyetin boyutunu etkileyebilir (165). Bu potansiyel ek faktörler nedeniyle kurşunun erkek fekunditesi üzerindeki olumsuz etkilerinin hangi organ veya hangi yolları etkilediği tam olarak ortaya çıkarılamamaktadır.

Fertil erkeklerle karşılaştırıldığında kan kurşun düzeyinin infertil erkeklerde daha yüksek olduğu (sırasıyla; 6.0 µg/dl ve 12.5 µg/dl) gösterilmiştir (166). Benzer şekilde, erkek işçilerin kan kurşun seviyelerinin 10 µg/dl ile 40 µg/dl aralığında olduğu ve bu olgularda infertilite riskinin artmış olduğu gösterilmiştir (167, 168). Bunun aksine, çok merkezli bir çalışmada, mesleki maruziyeti olan, kan kurşun düzeyi 29 µg/dl ile 37 µg/dl arasında olan erkeklerde fertilitate oranları ile kurşun maruziyeti arasında herhangi bir ilişki bulunmamıştır (169). Ancak başka bir çalışmada orta düzeyde kurşun maruziyetinin bile semen kalitesini kötü etkilediği konusunda ikna edici kanıtlar sunulmuştur (100). Bu çalışma, açıklanamayan infertilitesi olan çiftlerin erkek partnerlerinin önemli bir kısmının seminal plazmalarında yüksek kurşun düzeyi olduğunu saptayan ve bunların çevresel faktörlere bağlı infertiliteyi temsil ettiğini öne süren çalışmaların verileriyle de desteklenmektedir. (170).

Kurşun maruziyetinin erkek fertilitatesini nasıl azalttığını açıklayabilecek muhtemel birkaç yolak vardır. Örneğin, insanda akrozom reaksiyonunun erken aşamalarında çok sayıda kalsiyum ve potasyum kanallarının izoformları rol alabilir (170). Ek olarak, üreme organları kurşuna maruz kalmış ratlarda alkalik fosfatase ve

sodyum potasyum adenozintrifosfataz (Na-K-ATPase) gibi bazı enzimlerin aktivitelevlerinin azaldığı gösterilmiştir (171, 172). Başka bir sorun da, kurşun maruziyeti nedeniyle oksidatif stresin uyarılarak rekatif oksijen radikallerinin üretiminde artış olmasıdır. Reaktif oksijen radikalleri sülfihidril antioksidanların üretimini, enzim reaksiyonlarını ve nükleik asit hasarı yaparak DNA onarımını inhibe eder (7, 173).

Dokulardaki ROR seviyelerindeki artışın kurşun maruziyeti ile ilişkili bozukluklara katkı yaptığı varsayılmaktadır (174). Erkek üreme sistemi üzerine yapılan deneysel bir çalışmada, seminal sıvıdaki kurşun düzeyi ile spermatozodaki ROR düzeyleri arasında bir korelasyon olduğu gösterilmiştir (7). Diğer taraftan, uzun süre kurşuna maruz kalan insanlarda, kurşun kaynaklı ROR üretiminde artışa karşılık adaptasyon mekanizması olarak süperoksit dismutaz aktivitesinde artış olduğu gözlenmiştir (175). Örnek olarak, invitro olarak ROR'a maruz bırakılan rat spermlerinde prematür akrozom reaksiyonunun oluştuğu ve zona pellusidaya penetrasyon oranının azaldığı gösterilmiştir (176). Ayrıca, doza bağımlı olarak, kurşun kaynaklı oksidatif stresin, aralarında spermin de bulunduğu hedef dokularda farklı yanıtla yol açtığı bilinmektedir. Kurşuna maruz bırakılmış ratlarda yapılan çalışmalarda kurşunun ROR üretim yolaklarını aktive ederek serum testosteron düzeylerini azalttığı, kapasitasyonun erken başlamasına neden olduğu ve sperm fonksiyonlarını etkilediği gösterilmiştir (7). Ek olarak kronik kurşun maruziyeti olan ratların üreme organlarında lipit peroksit konsantrasyonunda artış olduğu gösterilmiştir (177). Bu çalışmaların sonuçları, kurşun kaynaklı ROR'un erkek üreme bozukluklarında önemli bir moleküler mekanizma olduğunu göstermiştir.

Literatür taramasında, kurşunun implantasyon açısından endometriyum üzerindeki olası etkilerini araştıran insan çalışmasına rastlanmadı. Sınırlı sayıdaki hayvan çalışmalarında kurşunun implantasyonu inhibe edici bir rol oynayabileceği gösterilmiştir (178, 179). Ancak, kurşun varlığı nedeniyle uterin kavitede artması olası ROR'ların, kaviteden geçen spermlerde erken akrozom reaksiyonunu uyarması veya hücrel toksik etkiyle implantasyon sürecinin zarar görmesi muhtemeldir. Bunun yanı sıra, kadınlarda yüksek kan kurşun seviyesinin overde p450 aromataz aktivitesini ve ER β ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (180). Nitekim, farelerde deneysel olarak kurşunun fertilize ovumun uterin duvara invazyonunu bozduğu gösterilmiştir (178). Fare modelinde intravenöz yoldan kurşun bileşiği verilmesinin implantasyonun invazyon aşamasını tamamen inhibe ettiği gösterilmiştir. Çiftleşmeden 3-5 gün sonra,

oral yoldan kurşun bileşiği vermenin de implantasyon ve gebelik oranlarını azalttığı gösterilmiştir (178). Bu çalışmanın sonuçları Wide'ın yaptığı hayvan çalışmasıyla da desteklenmiştir (179).

Bizim çalışmada, açıklanamayan infertil grupta 5/19 (%26.3) olgunun, kontrol grubunda ise 1/18 (%5) olgunun endometriyumunda kurşun saptandı. Kurşun seviyeleri açısından iki grup arasında anlamlı fark bulunmasa da, olgu bazında bakıldığında açıklanamayan infertil grupta hastaların %26'sının endometriyumunda kurşun saptanmıştır. Bu hastaların endometriyumunda aynı zamanda kadmiyum da saptandı. Dolayısıyla bu beş olgudaki etyolojik faktörün ağır metal olduğunu varsaysak bile kurşunun mu, kadmiyumun mu daha baskın bir etki gösterdiğini söyleyebilmek mümkün değildir.

5.3. Civa

Kimyasal form ve maruziyet biçimine bağlı olarak civanın ve bileşiklerinin geniş bir toksisite spektrumu bulunmaktadır (105). Civanın üreme fonksiyonlarına etkileri üzerine birçok insan ve hayvan çalışması bulunmaktadır. Birkaç derlemeye göre civa, spontan abortus, ölü doğum, konjenital malformasyonlar, infertilite, menstrüel bozukluklar ve ovulasyonun inhibisyonu gibi üreme problemlerine neden olabilir (9, 10, 181). Shen ve ark. (182) yaptıkları bir çalışmada civa kloritin farelerde oositin mayotik matürasyonunu etkileyerek in-vitro fertilizasyonu açıkça bloke ettiği ve farelerin üreme kapasitesini azalttığı gösterilmiştir. Diğer çalışmalarda da civa maruziyetinin kötü IVF sonuçlarıyla ilişkisi gösterilmiştir (183, 184).

Rao ve Sharma, civanın epididimal sperm canlılığını ve hareketliliğini önemli oranda azalttığını göstermiştir (185). İnfertil olguların büyük kısmında gözlenen bozulmuş sperm fonksiyonları oksidatif stres kaynaklı sperm membran hasarı ile açıklanabilir (143). Sodyum-potasyum ATPase'in oksidatif modifikasyonu sperm motilitesini ortadan kaldırabilir (186). Oksidatif stres sadece spermatozoanın fertilizasyon kapasitesini bozmaz, sperm kromatin bütünlüğünü etkiler ve tek ve çift sarmallı DNA kırıklarının artmasına da neden olur. (187). Memeli spermatozoalarının baş ve kuyruk membranında bulunan dışa-yönelimli Ca^{+2} -ATPase'in inhibisyonunun hücre içinde, spermın kadın üreme yollarındaki hareketi ve akrozom reaksiyonu için gerekli olan, Ca^{+2} 'nin birikime yol açtığı gösterilmiştir (188). Ca^{+2} -ATPase membrana bağlı bir enzim olduğu için, metal iyonları gibi herhangi bir antioksidan ajan nedeniyle

membran yapısında değişiklik olması bu enzimin inaktivasyonuna neden olabilir. Bu nedenle, civanın hücre membranını bozarak ve anormal akrozomal enzim ekzositozu paternine yol açarak fertilitate potansiyelini ciddi anlamda azalttığını önermek makul görünmektedir.

5.4. Arsenik

Üreme sağlığı üzerine ağır metallerin etkileri araştırıldığında, kadmiyum ve kurşun gibi arsenik ve civa ile ilgili verilerin de tartışmalı olduğu görülecektir. Özellikle arseniğin infertilite ile ilişkisine dair bilgilerimiz az sayıdaki erkek hayvan çalışmalarıyla sınırlıdır. Savabieasfahani ve ark. (189) yaptığı bir deneysel çalışmada arseniğin farelerde testiküler kitle artışı yaptığı bulunmasına karşılık Pant ve ark. (106) yaptığı çalışmada arseniğin testis ve aksesuar üreme organlarının ağırlığında herhangi bir değişikliğe yol açmadığı bildirilmiştir. Ancak bu çalışmada, arseniğin spermatogenezis aşamasındaki olumsuz etkilerine bağlı olarak sperm sayısında ve motilitesinde azalmanın, bununla birlikte anormal sperm sayısının artmış olduğu da gösterilmiştir. Memeli spermleri kuyruklarındaki nükleer kromatin ve sülfidril grupta büyük miktarda, tiyolden zengin protaminleri taşır. Bu kuyruk kısmı ile spermin stabilitesi ve hareketi sağlanır (190). Arsenik bir tiyol inhibitör madde olarak bilindiğine göre, motilitedeki azalmanın nedeni erkek üreme organlarındaki yüksek arsenik konsantrasyonları olabilir. Arsenik toksisitesinin mekanizması kesin olarak anlaşılamamakla birlikte, toksisite arseniğin proteinlerdeki sülfidril grubun veya bir enzimlerin tiyol içeren aktif kısmına bağlanabilmelerine yol açan elektrofilik doğaları nedeniyle oluşabilir (191).

Bizim çalışmaya dahil edilen toplam 37 olgunun hiçbirinin endometriyumunda arsenik veya civa saptanmamıştır. Kontrol grubunda da bu iki ağır metalin saptanmamış olması akla iki olasılığı getirmektedir; olguların yaşadığı çevrede bu iki ağır metalin çevresel kirleticiler arasında yer almaması veya bu iki ağır metalin endometriyumda birikebilme özellikleri olmaması. Çalışmaya dahil edilen olguların hepsi aynı coğrafik bölgede yaşadıklarından ilk olasılık akla yatkın görünmektedir. Bizim çalışmamızın en önemli handikapı da belki de burada açığa çıkmaktadır. Olgularımızın kan ağır metal düzeylerini ölçmediğimizden bu ağır metallerin kan düzeylerinin açıklanamayan infertilite ile ilişkisi çalışmamız açısından muamma olarak durmaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışmayla, açıklanamayan infertilitede endometriyal mikroçevredeki kadmiyumun, kısmen de kurşunun, etyolojik bir faktör olabileceği gösterilmiştir. Bilimsel çalışmalarla, özellikle kadmiyum ve kurşun başta olmak üzere, ağır metallerin, üreme sağlığı da dahil, insan sağlığı üzerine ciddi zararları olabileceği gösterilmiştir. Bu nedenle hükümetler toplum sağlığını korumak adına, sanayi kuruluşları için, atık temizleme ve emisyon tesislerinin kurulmasını zorunlu hale getirmeli ve bu bakımdan tüm sanayi kuruluşları sıkı bir biçimde denetlenmelidir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- İlginç olarak açıklanamayan infertilite olgularının endometriyal örneklerinin tümünde kadmiyum saptanırken kontrol grubunda sadece 6 olgunun endometriyal örneklerinde kadmiyum saptanmıştır.
- İnfertil hastaların endometriyal dokularında kadmiyum bulunma olasılığı, fertil bireylerin endometriyal dokularında kadmiyum bulunma olasılığına göre 3 kat artmış bulundu.
- Açıklanamayan infertil olguların endometriyum dokusundaki ortalama kadmiyum seviyesi (32.09 µg/l; 150 mg dokuda) kontrol olguların endometriyum dokusundaki ortalama kadmiyum seviyesinden (3.51 µg/l; 150 mg dokuda) istatistiksel olarak anlamlı biçimde daha yüksek bulundu.
- Açıklanamayan infertilite grubunda 5 olgunun endometriyumunda kurşun saptanırken, kontrol grubunda sadece 1 olgunun endometriyumunda kurşun saptanmıştır.
- İnfertil hastaların endometriyal dokularında kurşun bulunma olasılığı ile fertil bireylerin endometriyal dokularında kurşun bulunma olasılığı arasında anlamlı bir fark bulunmadı.
- Sadece endometriyumunda kurşun saptanan olgular açısından bakıldığında bir fark varmış gibi (5 infertil olgudaki ortalama kurşun seviyesi 0.21 µg/l, kontrol grubundaki tek olgunun kurşun seviyesi 0.03µg/l) görünse de, açıklanamayan infertil grup (ortalama kurşun seviyesi 0.057 µg/l) ile kontrol grubu (ortalama kurşun seviyesi 0.0017 µg/l) karşılaştırıldığında, endometriyumdaki kurşun seviyesi açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p=0.07).
- Çalışmaya dahil edilen olgulardan hiçbirinin endometriyumunda arsenik ve civa saptanmamıştır.
- Bu çalışmada, endometriyal dokuda yüksek seviyede kadmiyum (ortalama 32.09 µg/l; 150 mg dokuda) varlığının açıklanamayan infertilite etyolojisinde rolü olabileceği gösterildi.
- Etyolojisinde ağır metal gibi çevresel kirleticilerin de rolü olabileceği için, açıklanamayan infertil çiftler değerlendirilirken mesleki ve çevresel ağır metal maruziyetinin sorgulanması önerilebilir.

7. ÖZET

ENDOMETRİYAL AĞIR METAL (KADMIYUM, KURŞUN, CİVA VE ARSENİK) DÜZEYLERİNİN AÇIKLANAMAYAN İNFERTİLİTE ETYOLOJİSİNDEKİ ROLÜ

İnfertilite oldukça yaygın bir problemdir ve yaklaşık olarak her 7 çiftten birini etkilemektedir. İnfertilite nedeni araştırılırken çiftlerin yaklaşık %15-30'unda infertiliteyi açıklayacak bir neden bulunamamakta ve bu grup hastalar açıklanamayan infertil grup olarak adlandırılmaktadır. İnfertilite üzerine yapılan pek çok çalışmada, spermin dışı genital yolundaki hareketi, ovumla birleşmesi ve embriyonun uterin kaviteye implantasyonu süreçlerinde birçok moleküler faktör ve mekanizmanın rol oynadığı gösterilmiştir. Ağır metallerin bu süreçlerin herhangi birinde olumsuz rol oynayabileceği insan ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu çalışmada, açıklanamayan infertilite tanısı alan çiftlerin kadın partnerinin endometriyum dokusundaki ağır metal (kadmiyum, kurşun, civa ve arsenik) düzeylerinin saptanması ve sonuçların, fertil kadınların endometriyum dokusundaki aynı ağır metallerin düzeyleri ile karşılaştırılarak açıklanamayan infertilite etyolojisindeki rolünün araştırılması amaçlandı.

Çalışmaya 19'u açıklanamayan infertil, 18'i fertil-kontrol olmak üzere toplam 37 kadın olgu dahil edildi. İmplantasyon penceresi olarak kabul edilen, menstrüel siklusun 20-24. günlerinde, olgulardan endometriyal doku örnekleri alındı. Atomik absorpsiyon spektrometresi yöntemiyle bu örneklerdeki kadmiyum, kurşun, civa ve arsenik düzeyleri tespit edildi.

İnfertil gruptaki 19 hastanın tümünün endometriyum dokusunda kadmiyum saptanırken (%100), kontrol grubunda sadece 6/18 (%33) olguda kadmiyum saptandı ($p=0.001$). İnfertil hastaların endometriyal dokularında kadmiyum bulunma olasılığı, fertil bireylerin endometriyal dokularında kadmiyum bulunma olasılığına göre 3 kat artmış bulundu. İnfertil grupta 5, kontrol grubunda 1 olgu olmak üzere toplam 6 olgunun endometriyal doku örneklerinde kurşun saptandı ($p=0.18$). Çalışmaya dahil edilen olgulardan hiçbirinin endometriyumunda civa ve arsenik tespit edilemedi. İnfertil gruptaki endometriyal dokuda ortalama kadmiyum düzeyi 32.09 $\mu\text{g/l}$ (aralık: 16.92-61.52) olarak saptanırken, kontrol grubunda 3.51 $\mu\text{g/l}$ (aralık: 0.00-16.39)

olarak saptandı ve aradaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p=0.0001$). Kurşun düzeyleri açısından infertil grup ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı (sırasıyla; $0.057 \mu\text{g/l}$ (aralık: $0.00-0.32$), $0.0017 \mu\text{g/l}$ (aralık: $0.00-0.03$); $p=0.07$).

Sonuç olarak; bu çalışmada, endometriyal dokuda yüksek seviyede kadmiyum varlığının açıklanamayan infertilite etyolojisinde rolü olabileceği gösterildi.

Anahtar Kelimeler: Açıklanamayan İnfertilite, Ağır Metal, Arsenik, Civa, Endometriyum, Kadmiyum, Kurşun.

8. SUMMARY

THE ROLE OF THE ENDOMETRIAL HEAVY METAL (CADMIUM, LEAD, MERCURY AND ARSENIC) CONCENTRATIONS IN THE ETIOLOGY OF UNEXPLAINED INFERTILITY

Infertility is a common problem and affects approximately one in seven couples. 15-30% of couples who are unable to conceive are determined to have unexplained infertility because standard clinical investigation have not highlighted any abnormalities. Several research and studies on infertility showed that many molecular factors and mechanism have a role during sperm transportation, fertilization and embryo implantation. Evidence from animal and human studies demonstrated that heavy metals may have detrimental effect on these processes. The aim of this study was to determine the role of heavy metals on the etiology of unexplained infertility. For this purpose we compare endometrial heavy metal (cadmium, lead, mercury and arsenic) concentrations of patients with unexplained infertility and normal fertile (control) women.

Nineteen (19) women with unexplained infertility and 18 normal fertile women were enrolled in this study. An endometrial biopsy was collected from women during the putative window of implantation (cycle days 20-24). Concentration of cadmium, lead, mercury and arsenic were measured in endometrial biopsy specimen using atomic absorption spectrometry.

Out of 19 cases in study group, cadmium was detected in all cases with unexplained infertility (100%), whereas it was detected only 6/ 18 (33%) of fertile control women and the difference was found to be statistically significant ($p=0.001$). Cases with unexplained infertility have an increased risk ratio 3.0 for detection of cadmium in endometrial biopsy sample than fertile controls. Lead was detected 5 cases with unexplained infertility (26%) and 1 case in the control group ($p=0.18$). Mercury and arsenic were not detected in any of the endometrial samples of unexplained infertile cases and fertile controls women. Infertile women have a higher concentration cadmium in endometrial biopsy sample than fertile control women (32.09 $\mu\text{g/l}$ (range: 16.92-61.52) versus 3.51 $\mu\text{g/l}$ (range: 0.00-16.39), respectively; $p=0.0001$) There were no statistically significant differences between cases and

controls in the concentrations of lead (0.057 µg/l (range: 0.00-0.32) versus 0.0017 µg/l (range: 0.00-0.03), respectively; p=0.07).

In conclusion, a significant difference in endometrial cadmium levels between unexplained infertility and fertile women suggests that cadmium may be involved in etiology of unexplained infertility.

Key Words: Arsenic, Cadmium, Endometrium, Heavy Metal, Lead, Mercury, Unexplained Infertility

9. KAYNAKLAR

1. Mosher WD., Pratt WF. Fecundity and infertility in United States: incidence and trends. *Fertil Steril* 1991; 56: 192-3.
2. Crosignani PG, Collins J, Cooke ID, Diczfalusy E, Rubin B. Unexplained infertility (recommendations of ESHRE workshop). *Hum Reprod* 1993; 8: 977-980.
3. European Society of Human Reproduction and Embryology. 1992.
4. Kamel RM Management of the infertile couple: an evidence-based protocol. *Reprod Biol Endocrinol.* 2010; 8: 21. Review.
5. Spandorfer SD, Davis OK, Barmat LI, Chung PH, Rosenwaks Z. Relationship between maternal age and aneuploidy in in vitro fertilization pregnancy loss. *Fertil Steril* 2004; 81: 1265-1269.
6. Benoff S, Centola GM, Millan C, Napolitano B, Marmar JL, Hurley IR. Increased seminal plasma lead levels adversely affect the fertility potential of sperm in IVF. *Hum Reprod.* 2003;18: 374-83.
7. Vige M, Smith DR, Chi-Hsu P. How does lead induce male infertility? *Iranian Journal of Reproductive Medicine* 2011; 9: 1-8. Review.
8. Nampoothini LP, Gupta S. Simultaneous effect of lead and cadmium on granulosa cells: a cellular model for ovarian toxicity. *Reprod Toxicol* 2006; 21: 179–185.
9. Gardella JR, Hill 3rd JA. Environmental toxins associated with recurrent pregnancy loss. *Sem Reprod Med* 2000; 18: 407–424.
10. Schuurs AH, Reproductive toxicity of occupational mercury. A review of the literature. *J. Dent* 1999; 27: 249–256. Review
11. Ozturk M. TBMM çevre komisyonu. www.mozturk.net
12. Kahvecioglu Ö, Kartal G, Güven A, Timur S. Metallerin Çevresel Etkileri-I. *Metaller Dergisi* 2004; 136: 47-53.
13. Gerhard I, Monga B, Waldbrenner A, Runnebaum B. Heavy metals and fertility. *J Toxicol Environ Health A.* 1998; 54: 593-611.
14. <http://www.lenntech.com/periodic-chart.htm>
15. Lahdetie J. Occupation- and exposure-related studies on human sperm. *J Occup Environ Med* 1995; 37: 922-930.
16. Koizumi T, Waalkes MP. Effects of zinc on the distribution and Toxicity of Cadmium in isolated interstitial cells of the rat testis. *Toxicology* 1989; 57: 137-146.
17. Sokol RZ, Wang S, Wan YJ, Stanczyk FZ, Gentschein E, Chapin RE. Long-term, low-dose lead exposure alters the gonadotropin-releasing hormone system in the male rat. *Environ Health Perspect* 2002; 110: 871-874.
18. Benoff S, Hauser R, Marmar JL, Hurley IR, Napolitano B, Centola GM. Cadmium concentrations in blood and seminal plasma: correlations with sperm number and motility in three male populations (infertility patients, artificial insemination donors, and unselected volunteers). *Mol Med.* 2009; 15: 248-62.
19. Aschengrau A, Zierler S, Cohen A. Quality of community drinking water and the occurrence of spontaneous abortion. *Arch Env Health* 1989; 44: 283–290.
20. Chattopadhyay S, Ghosh S, Chaki S, Debanath J, Ghosh D. Effect of sodium arsenite on plasma levels of gonadotrophins and ovarian steroidogenesis in mature albino rats: duration dependent responses. *J Toxicol Sci* 1999; 24: 425–431.
21. Michaluk A, Kochman K. Involvement of copper in female reproduction. *Reprod Biol.* 2007; 7: 193-205.

22. Wong WY, Merkus HM, Thomas CM. et al. Effects of folic acid and zinc sulphate on male factor subfertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Fertil Steril.* 2002; 77: 491–8.
23. Shah K, Sivapalan G, Gibbons N, Tempest H, Griffin DK. The genetic basis of infertility. *Reproduction.* 2003; 126: 13-25.
24. Nikolaou D, Templeton A. Early ovarian ageing: a hypothesis. Detection and clinical relevance. *Hum Reprod.* 2003; 18: 1137-9.
25. Yong PY, Baird DT, Thong KJ, McNeilly AS, Anderson RA. Prospective analysis of the relationships between the ovarian follicle cohort and basal FSH concentration, the inhibin response to exogenous FSH and ovarian follicle number at different stages of the normal menstrual cycle and after pituitary down-regulation. *Hum Reprod.* 2003; 18: 35-44.
26. Smith S, Pfeifer S, Collins J. Diagnosis and management of female infertility. *JAMA* 2003; 290: 1767-1770.
27. Preutthipan S, Linasmita V. A prospective comparative study between hysterosalpingography and hysteroscopy in the detection of intrauterin pathology in patients with infertility. *J Obstet Gynecol Res* 2003; 29: 33.
28. Check JH. The infertile male--diagnosis. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2006; 33: 133-9. Review.
29. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 5th ed. Geneva: World Health Organization 2010.
30. Practice committee of the American Society for Reproductive Medicine. 2006.
31. Siristatidis C, Bhattacharya S. Unexplained infertility: does it really exist? Does it matter? *Hum Reprod.* 2007; 22: 2084-7.
32. Vardı N. Fertilizasyon. In: Yardımcı Üreme Teknikleri, Temel Klinik ve Embriyolojik Uygulamalar. Editör: Prof. Dr. Önder Çelik, Adana, Türkiye. 2011: 71-82.
33. Elder K, Dale B. *In Vitro Fertilization. Second Edition.* Cambridge University Press, Cambridge, 2003.
34. Hardy DM. *Fertilization.* Academic Press, USA, 2002.
35. Nilsson BO, Ljung L. X-ray micro analyses of cations (Na, K, Ca) and anions (S, P, Cl) in uterine secretions during blastocyst implantation in the rat. *J Exp Zool.* 1985; 234: 415-21.
36. Tosti E. Dynamic roles of ion currents in early development. *Mol Reprod Dev.* 2010; 77: 856-67.
37. Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 2005; 434: 234-8.
38. Strowitzki T, Germeyer A, Popovici R, von Wolff M. The human endometrium as a fertility-determining factor. *Hum Reprod Update.* 2006; 12: 617-30. Review.
39. Gambino LS, Wreford NG, Bertram JF, Dockery P, Lederman F, Rogers PA. Angiogenesis occurs by vessel elongation in proliferative phase human endometrium. *Hum Reprod.* 2002; 17: 1199-206.
40. Hoozemans DA, Schats R, Lambalk CB, Homburg R, Hompes PG. Human embryo implantation: current knowledge and clinical implications in assisted reproductive technology. *Reprod Biomed Online.* 2004; 9: 692-715. Review.
41. Wang H, Critchley HO, Kelly RW, Shen D and Baird DT. Progesterone receptor subtype B is differentially regulated in human endometrial stroma. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 407–412.

42. Bergeron C. Morphological changes and protein secretion induced by progesterone in the endometrium during the luteal phase in preparation for nidation. *Hum Reprod* 2000; 15: 119–128.
43. Mote PA, Balleine RL, McGowan EM and Clarke CL. Heterogeneity of progesterone receptors A and B expression in human endometrial glands and stroma. *Hum Reprod* 2000; 15: 48–56.
44. Irwin JC, Kirk D, King RJB, Quigley MM and Gwatkin RBL. Hormonal regulation of human endometrial stromal cells in culture: an in vitro model for decidualization. *Fertil Steril* 1989; 52: 761–768.
45. Tseng L, Gao JG, Chen R, Zhu HH, Mazella J and Powell DR . Effect of progestin, antiprogestin, and relaxin on the accumulation of prolactin and insulin-like growth factor-binding protein-1 messenger ribonucleic acid in human endometrial stromal cells. *Biol Reprod* 1992; 47: 441–450.
46. Christian M, Marangos P, Mak I, McVey J, Barker F, White J and Brosens JJ Interferon- γ modulates prolactin and tissue factor expression in differentiating human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 2001; 142: 3142–3151.
47. Attar R, Kuru O, Attar E. İmplantasyon ve Erken Gebelik In: Yardımcı Üreme Teknikleri, Temel Klinik ve Embriyolojik Uygulamalar. Editör: Prof. Dr. Önder Çelik, Adana, Türkiye. 2011: 121-126.
48. Usadi RS, Murray MJ, Bagnell RC, Fritz MA, Kowalik AI, Meyer WR and Lessey BA. Temporal and morphologic characteristics of pinopod expression across the secretory phase of the endometrial cycle in normally cycling women with proven fertility. *Fertil Steril* 2003; 79: 970–974.
49. Nilsson O. Ultrastructure of mouse uterine surface epithelium under different estrogenic influences. 3. Late effect of estrogen administered to spayed animals. *J Ultrastruct Res* 1958; 2: 185–199.
50. Johannisson E and Nilsson L. Scanning electron microscopic study of the human endometrium. *Fertil Steril* 1972; 23: 613–625.
51. Martel D, Frydman R, Glissant M, Maggioni C, Roche D and Psychoyos A. Scanning electron microscopy of postovulatory human endometrium in spontaneous cycles and cycles stimulated by hormone treatment. *J Endocrinol* 1987; 114: 319–324.
52. Murphy CR, Rogers PA, Leeton J, Hosie M, Beaton L and Macpherson A. Surface ultrastructure of uterine epithelial cells in women with premature ovarian failure following steroid hormone replacement. *Acta Anat (Basel)* 1987; 130: 348–350.
53. Aghajanova L, Stavreus-Evers A, Nikas Y, Hovatta O and Landgren BM. Coexpression of pinopodes and leukemia inhibitory factor, as well as its receptor, in human endometrium. *Fertil Steril* 2003; 79: 808–814.
54. Stavreus-Evers A, Nikas G, Sahlin L, Eriksson H and Landgren BM . Formation of pinopodes in human endometrium is associated with the concentrations of progesterone and progesterone receptors. *Fertil Steril* 2001; 76: 782–791.
55. Lessey BA, Damjanovich L, Coutifaris C, Castelbaum A, Albelda SM and Buck CA. Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. *J Clin Invest* 1992; 90: 188–195.
56. Bentin-Ley U, Pedersen B, Lindenberg S, Larsen JF, Hamberger L and Horn T. Isolation and culture of human endometrial cells in a threedimensional culture system. *J Reprod Fertil* 1994; 101: 327–332.

57. Bentin-Ley U, Sjogren A, Nilsson L, Hamberger L, Larsen JF and Horn T (Presence of uterine pinopodes at the embryo–endometrial interface during human implantation in vitro. *Hum Reprod* 1999; 14:515–520.
58. Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update*. 2006;12: 731-46. Review.
59. Denker HW. Implantation: a cell biological paradox. *J Exp Zool*. 1993; 266: 541-58.
60. Aplin JD. The cell biological basis of human implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2000; 14: 757-64.
61. Simón C, Martín JC, Pellicer A. Paracrine regulators of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2000; 14: 815-26.
62. Psychoyos A. Hormonal control of ovoid implantation. *Vitam Horm*. 1973; 31: 205-225.
63. Paria BC, Reese J, Das SK and Dey SK. Deciphering the cross-talk of implantation: advances and challenges. *Science* 2002; 296: 2185–2188.
64. de los Santos MJ, Mercader A, Galán A, Albert C, Romero JL, Pellicer A. Implantation rates after two, three, or five days of embryo culture. *Placenta*. 2003; 24: 13-9.
65. Simon C, Moreno C, Remohi J and Pellicer A. Cytokines and embryo implantation. *J Reprod Immunol*. 1998; 39: 117–131.
66. Ledee-Bataille N, Lapree-Delage G, Taupin JL, Dubanchet S, Frydman R and Chaouat G. Concentration of leukaemia inhibitory factor (LIF) in uterine flushing fluid is highly predictive of embryo implantation. *Hum Reprod*. 2002; 17: 213–218.
67. Albelda SM and Buck CA. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J* 1990; 4: 2868–2880.
68. Lessey BA. Adhesion molecules and implantation. *J Reprod Immunol* 2002; 55: 101-112.
69. Lessey BA, Castelbaum AJ, Sawin SW, Buck CA, Schinnar R and Bilker W. Aberrant integrin expression in the endometrium of women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 643–649.
70. Lessey BA, Castelbaum AJ, Sawin SW and Sun J. Integrins as markers of uterine receptivity in women with primary unexplained infertility. *Fertil Steril* 1995; 63: 535–542.
71. Lessey BA, Yeh I, Castelbaum AJ, Fritz MA, Ilesanmi AO and Korzeniowski P. Endometrial progesterone receptors and markers of uterine receptivity in the window of implantation. *Fertil Steril* 1996; 65: 477–483.
72. Meyer WR, Castelbaum AJ, Somkuti S, Sagoskin AW, Doyle M and Harris JE. Hydrosalpinges adversely affect markers of endometrial receptivity. *Hum Reprod* 1997; 12: 1393–1398.
73. Ejskjaer K, Sorensen BS, Poulsen SS, Mogensen O, Forman A and Nexø E. Expression of the epidermal growth factor system in human endometrium during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod*. 2005; 11: 543–551.
74. Imai T, Kurachi H, Adachi K, Adachi H, Yoshimoto Y, Homma H, Tadakoro C, Takeda S, Yamaguchi M and Sakata M. Changes in epidermal growth factor receptor and the levels of its ligands during menstrual cycle in human endometrium. *Biol Reprod*. 1995; 52: 928–938.
75. Reis FM, Lhullier C, Edelweiss MI and Spritzer PM. In vivo assessment of the regulation of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor (EGF),

- and EGF receptor in the human endometrium by medroxyprogesterone acetate. *J Assist Reprod Genet.* 2005; 22: 19–24.
76. Strous GJ and Dekker J. Mucin-type glycoproteins. *Crit Rev Biochem. Mol Biol* 1992; 27: 57–92.
 77. Braga VM and Gendler SJ Modulation of Muc-1 mucin expression in the mouse uterus during the estrus cycle, early pregnancy and placentation. *J Cell Sci* 1993; 105: 397–405.
 78. Horne AW, White JO, Lalani el-N, Mobberley MA, Margara RA, Trew GH and Ryder TA. Analysis of epitopes on endometrial epithelium by scanning immunoelectron microscopy. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 292:102–108.
 79. Meseguer M, Aplin JD, Caballero-Campo P, O'Connor JE, Martin JC, Remohi J, Pellicer A and Simon C. Human endometrial mucin MUC1 is upregulated by progesterone and down-regulated in vitro by the human blastocyst. *Biol Reprod* 2001; 64: 590–601.
 80. Thathiah A and Carson DD. MT1-MMP mediates MUC1 shedding independent of TACE/ADAM17. *Biochem J* 2004; 382: 363–373.
 81. Stewart CL. Leukaemia inhibitory factor and the regulation of preimplantation development of the mammalian embryo. *Mol Reprod Dev* 1994; 39: 233–238.
 82. Laird SM, Tuckerman EM, Dalton CF, Dunphy BC, Li TC and Zhang X. The production of leukaemia inhibitory factor by human endometrium: presence in uterine flushings and production by cells in culture. *Hum Reprod* 1997; 12: 569–574.
 83. Giess R, Tanasescu I, Steck T and Sendtner M. Leukaemia inhibitory factor gene mutations in infertile women. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 581–586.
 84. Kojima K, Kanzaki H, Iwai M, Hatayama H, Fujimoto M, Inoue T, Horie K, Nakayama H, Fujita J and Mori T. Expression of leukemia inhibitory factor in human endometrium and placenta. *Biol Reprod* 1994; 50: 882–887.
 85. Bischof P, Martelli M, Campana A, Itoh Y, Ogata Y and Nagase H Importance of matrix metalloproteinases in human trophoblast invasion. *Early Pregnancy* 1995; 1: 263–269.
 86. Kim JJ, Jaffe RC and Fazleabas AT. Blastocyst invasion and stromal response in primates. *Hum Reprod* 1999; 14: 45–55.
 87. Irwin JC, Utian WH and Eckert RL. Sex steroids and growth factors differentially regulate the growth and differentiation of cultured human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 1991; 129: 2385–2392.
 88. Brar AK, Frank GR, Richards RG, Meyer AJ, Kessler CA, Cedars MI, Klein DJ and Handwerger S. Laminin decreases PRL and IGFBP-1 expression during in vitro decidualization of human endometrial stromal cells. *J Cell Physiol* 1995; 163: 30–37.
 89. Zhou J and Bondy C. Insulin-like growth factor-II and its binding proteins in placental development. *Endocrinology* 1992; 131: 1230–1240.
 90. Irwin JC and Giudice LC. Insulin-like growth factor binding protein-1 binds to placental cytotrophoblast alpha5beta1 integrin and inhibits cytotrophoblast invasion into decidualized endometrial stromal cultures. *Growth Horm IGF Res* 1998; 8: 21–31.
 91. Graham CH, Lysiak JJ, McCrae KR and Lala PK. Localization of transforming growth factor-beta at the human fetal-maternal interface: role in trophoblast growth and differentiation. *Biol Reprod* 1992; 46: 561–572.

92. Pampfer S, Tabibzadeh S, Chuan FC and Pollard JW. Expression of colony-stimulating factor-1 (CSF-1) messenger RNA in human endometrial glands during the menstrual cycle: molecular cloning of a novel transcript that predicts a cell surface form of CSF-1. *Mol Endocrinol* 1991; 5: 1931–1938.
93. Giudice LC Microarray expression profiling reveals candidate genes for human uterine receptivity. *Am J Pharmacogenomics* 2004; 4: 299–312.
94. Taylor HS, Bagot C, Kardana A, Olive D and Arici A. HOX gene expression is altered in the endometrium of women with endometriosis. *Hum Reprod* 1999; 14: 1328–1331.
95. Cermik D, Selam B and Taylor HS. Regulation of HOXA-10 expression by testosterone in vitro and in the endometrium of patients with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 238–243.
96. John H. Duffus ""Heavy metals" a meaningless term? (IUPAC Technical Report)" *Pure and Applied Chemistry* 2002; 74: 793-807.
97. <http://en.wikipedia.org>.
98. Satarug S, Moore MR. Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. *Environ. Health* 2004; 112: 1099–1103.
99. Bernard A. Renal dysfunction induced by cadmium: biomarkers of critical effects. *BioMetals* 2004; 17: 519–523.
100. Telisman S, Cvitkovic P, Juraasovic J, Pizent A, Gavella M, Rocic B. Semen quality and reproductive endocrine function in relation to biomarkers of lead, cadmium, zinc and copper in men. *Environ. Health* 2000; 108: 45-53.
101. Teijon C, Olmo R, Blanco D, Romero A, Teijon JM. Low doses of lead: effects on reproduction and development in rats. *Biol Trace Elem Res* 2006; 111:151-165.
102. Crinnion WJ. Environmental medicine, part three: long-term effects of chronic low-dose mercury exposure. *Altern Med Rev* 2000; 5: 209-23. Review.
103. Arabi M, Sanyal SN, Kanwar U, Anand RJK. The Effect of Antioxidants on Nicotine and Caffeine Induced Changes in Human Sperm-an in vitro Study. In *Male fertility and lipid metabolism*. S.R. De Vriese and A.B. Christopher (Eds.). AOCS Press, Champaign, IL, USA., pp: 250-267.
104. Arabi M, Heydarnejad MS. In vitro mercury exposure on spermatozoa from normospermic individuals. *Pak J Biol Sci* 2007; 10: 2448-53.
105. Satoh H. Behavioral teratology of mercury and its compounds. *Tohoku J. Exp. Med* 2003; 201: 1–9.
106. Pant N, Kumar R, Murthy RC, Srivastava SP. Male reproductive effect of arsenic in mice. *Biomaterials* 2001; 14: 113-7.
107. Winski SL, Carter DE. 1998 Arsenic toxicity in human erythrocytes characteristics of morphologic changes and determination of the mechanism of damage *J Toxicol Environ Hlth* 1998; 53: 345–355.
108. Üstün YE. İnfertil Çiftin Değerlendirilmesi In: *Yardımcı Üreme Teknikleri, Temel Klinik ve Embriyolojik Uygulamalar*. Editör: Prof. Dr. Önder Çelik, Adana, Türkiye. 2011: 129-136.
109. Cortelekoglu AT, Koksall C, Ercan M, et al. The Role of Trace Elements in The Etiology of Abdominal Aortic Aneurysms. *Turkish J Torac Cardiovasc Surg* 2003; 11: 185-187.
110. Sinclair S. Male infertility: nutritional and environmental considerations. *Altern Med Rev* 2000; 5: 28-38.

111. Queiroz EK, Waissmann W: Occupational exposure and effects on the male reproductive system. *Cad Saude Publica* 2006; 22: 485-493.
112. Thompson J, Bannigan J. Cadmium: toxic effects on the reproductive system and the embryo. *Reprod. Toxicol.* 2008; 25: 304–15.
113. Sinawat, S. The environmental impact on male fertility. *J. Med. Assoc. Thailand* 2000; 83: 880–885.
114. Gerhard, I, Runnebaum, B. The limits of hormone substitution in pollutant exposure and fertility disorders. *Z. Gynakologie* 1992; 114: 593–602.
115. Choi SM, Yoo SD, Lee BM. Toxicological characteristics of endocrine-disrupting chemicals: developmental toxicity, carcinogenicity, and mutagenicity. *J. Toxicol. Environ. Health B* 2004; 7: 1–24.
116. Wu SY, Tian J, Wang MZ, Pan BJ, L u HD, Wang ZM, et al. The effect of cadmium pollution on reproductive health in females. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 2004; 25: 852–5.
117. Alexander BH, Checkoway H, Faustman EM, van Netten C, Muller CH, Ewers TG. Contrasting associations of blood and semen lead concentrations with semen quality among lead smelter workers. *Am J Ind Med* 1998; 34: 464-469.
118. Sallmen M. Exposure to lead and male fertility. *Int J Occup Med Environ Health* 2001; 14: 219-222.
119. Nordberg GF, Nordberg M. Biological monitoring of cadmium. In: Clarkson TW, Friberg L, Nordberg GF, Sager PR, eds. *Biological monitoring of toxic metals*. 1988:151–68.
120. Berlin M, Blanks R, Catton M, Kazantzis G, Mottet NK, Samiullah Y. Birth weight of children and cadmium accumulation in placentas of female nickel-cadmium (long-life) battery workers. In: Nordberg GF, Herber RFM, Alessio L, eds. *Cadmium in the human environment: toxicity and carcinogenicity*. Lyon: International Agency for Research on Cancer, no. 118; 1992: 257– 62.
121. Kuhnert BR, Kuhnert PM, Zarlingo TJ. Associations between placental cadmium and zinc and age and parity in pregnant women who smoke. *Obstet Gynecol.* 1988; 71: 67–70.
122. Mendiola J, Moreno JM, Roca M, Vergara-Juárez N, Martínez-García MJ, García-Sánchez A, Elvira-Rendueles B, Moreno-Grau S, López-Esp n JJ, Ten J, Bernabeu R, Torres-Cantero AM. Relationships between heavy metal concentrations in three different body fluids and male reproductive parameters: a pilot study. *Environ Health.* 2011; 10: 6
123. Leoni G, Bogliolo L, Deiana G, Berlinguer F, Rosati I, Pintus PP, Ledda S, Naitana S. Influence of cadmium exposure on in vitro ovine gamete dysfunction. *Reprod Toxicol.* 2002; 16: 371-77.
124. Johnson MD, Kenney N, Stoica A, Hilakivi-Clarke L, Singh B, Chepko G, Clarke R, Sholler PF, Lirio AA, Foss C, Reiter R, Trock B, Paik S, Martin MB. Cadmium mimics the in vivo effects of estrogen in the uterus and mammary gland. *Nat Med.* 2003; 9: 1081-4.
125. Beyersmann D, Hechtenberg S. Cadmium, gene regulation, and signalling in mammalian cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 144: 246–7.
126. Hamada T, Tanimoto A, Sasaguri Y. Apoptosis induced by cadmium. *Apoptosis* 1997; 2: 359–67.
127. Foote RH. Fertility of rabbit sperm exposed in vitro to cadmium. *Reprod Toxicol* 1999; 13: 443–9.

128. Hew KW, Heath GL, Jiwa AH, Welsh NJ. Cadmium in vivo causes disruption of tight junction-associated microfilaments in rat Sertoli cells. *Biol Reprod* 1993; 49: 840–9.
129. Piasek M, Laskey JW. Acute cadmium exposure and ovarian steroidogenesis in cycling and pregnant rats. *Reprod Toxicol*. 1994; 8: 495–507.
130. Klaassen CD, Lehman-McKeeman LD. Induction of metallothionein. *J Am College Toxicol*. 1989; 8: 1315–21.
131. Jolibois LS Jr, Shi W, George WJ, Henson MC, Anderson MB. Cadmium accumulation and effects on progesterone release by cultured human trophoblast cells. *Reprod Toxicol*. 1999; 13: 215–21.
132. Zhang W, Jia H. Effect and mechanism of cadmium on the progesterone synthesis of ovaries. *Toxicology*. 2007; 239: 204–12.
133. Di Sant' Agnese PA, Jensen KD, Levin A, Miller RK. Placental toxicity of cadmium in the rat: an ultrastructural study. *Placenta*. 1983; 4: 149–64.
134. Stoica A, Katzenellenbogen BS, Martin MB. Activation of estrogen receptor-alpha by the heavy metal cadmium. *Mol Endocrinol*. 2000; 4: 545–53.
135. Guevel RL, Petit FG, Goff PL, Metivier R, Valotaire Y, Pakdel F. Inhibition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) estrogen receptor activity by cadmium. *Biol Reprod*. 2000; 63: 259–266.
136. Noack-Fuller G, De Beer C, Seibert H. Cadmium, lead, selenium, and zinc in semen of occupationally exposed men. *Andrologia* 1993; 25: 7–12.
137. Hovatta O, et al. Aluminum, lead and cadmium concentrations in seminal plasma and spermatozoa, and semen quality in Finnish men. *Hum. Reprod*. 1998; 13: 115–9.
138. Kasperczyk A, et al. Lead and cadmium concentration in human semen. *Ginekol. Pol.* 2002;73:449–53. Abstract.
139. Wassarman PM. Zona pellucida glycoprotein ZP3: a versatile player during mammalian fertilisation. *J Reprod Fertil* 1999; 116: 211–6.
140. Koizumi T, Li ZG. Role of oxidative stress in single-dose, cadmium-induced testicular cancer. *J Toxicol Environ Health* 1992; 37: 25–36.
141. Ruder EH, Hartman TJ, Blumberg J, Goldman MB. Oxidative stress and antioxidants: exposure and impact on female fertility. *Hum Reprod Update*. 2008; 14: 345–57.
142. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 7915–7922.
143. Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 1996; 48: 835–850.
144. Duru NK, Morshedi M, Schuffner A, Oehninger S. Semen treatment with progesterone and/or acetyl-L-carnitine does not improve sperm motility or membrane damage after cryopreservation-thawing. *Fertil Steril* 2000; 74: 715–720.
145. Walsh SW, Vaughan JE, Wang Y, Roberts LJ, 2nd. Placental isoprostane is significantly increased in preeclampsia. *FASEB J* 2000; 14: 1289–1296.
146. Sikka SC. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr Med Chem* 2001; 8: 851–862.
147. Massányi P, Lukác N, Uhrin V, Toman R, Pivko J, Rafay J, Forgács Z, Somosy Z. Female reproductive toxicology of cadmium. *Acta Biol Hung*. 2007; 58: 287–99.

148. Liu J, Huang H, Zhang W, Li H. Cadmium-induced increase in uterine wet weight and its mechanism. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2010; 89: 43-9.
149. Vahter M, Akesson A, Liden C, Ceccatelli S, Berglund M. Gender differences in the disposition and toxicity of metals. *Environ. Res.* 2007; 104: 85–95.
150. Bjorkman L, Vahter M, Pedersen NL. Both the environment and genes are important for concentrations of cadmium and lead in blood. *Environ. Health Perspect.* 2000; 108: 719–22.
151. Gunn SA, Gould TC, Anderson WAD. Strain differences in susceptibility of mice and rats to cadmium-induced testicular damage. *J. Reprod. Fertil.* 1965;10: 273–275.
152. Dalton TP, et al. Refining the mouse chromosomal location of Cdm, the major gene associated with susceptibility to cadmium-induced testicular necrosis. *Pharmacogenetics* 2000; 10: 141–51.
153. Benoff S, Auburn K, Marmar JL, Hurley IR. Link between low-dose environmentally relevant cadmium exposures and asthenozoospermia in a rat model. *Fertil. Steril.* 2008; 89: 73–9.
154. Tsutsumi R, Hiroi H, Momoeda M, Hosokawa Y, Nakazawa F, Yano T, Tsutsumi O, Taketani Y. Induction of early decidualization by cadmium, a major contaminant of cigarette smoke. *Fertil Steril.* 2009; 91: 1614-7.
155. Fluhr H, Krenzer S, Deperschmidt M, Zwirner M, Wallwiener D, Licht P. Human chorionic gonadotropin inhibits insulin-like growth factor-binding protein-1 and prolactin in decidualized human endometrial stromal cells. *Fertil Steril* 2006; 86: 236–8.
156. Fujimoto J, Ichigo S, Hori M and Tamaya T. Alteration of E-cadherin, alpha- and beta-catenin mRNA expression in human uterine endometrium during the menstrual cycle. *Gynecol Endocrinol.* 1996; 10: 187–191.
157. Riethmacher D, Brinkmann V and Birchmeier C. A targeted mutation in the mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92: 855–859.
158. Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell.* 1996; 84: 345–357.
159. Huber O, Bierkamp C and Kemler R. Cadherins and catenins in development. *Curr Opin Cell Biol.* 1996; 8: 685–691.
160. Prozialeck WC, Lamar PC. Cadmium (Cd²⁺) disrupts E-cadherindependent cell–cell junctions in MDCK cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1997; 33: 516–26.
161. Dalle Donne I, Milzani A, Colombo R. Actin assembly by cadmium ions. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1: 5–17.
162. Silbergeld EK. Lead in bone: implications for toxicology during pregnancy and lactation. *Environ. Health Perspect.* 1991; 91: 63–70.
163. Johansson L. Premature acrosome reaction in spermatozoa from lead-exposed mice. *Toxicology* 1989; 54: 151-162.
164. Hsu PC, Hsu CC, Liu MY, Chen LY, Guo YL. Lead-induced changes in spermatozoa function and metabolism. *J Toxicol Environ Health A* 1998; 55: 45-64.
165. Apostoli P, Bellini A, Porru S, Bisanti L. The effect of lead on male fertility: a time to pregnancy (TTP) study. *American journal of industrial medicine* 2000; 38: 310-315.

166. Pant N, Upadhyay G, Pandey S, Mathur N, Saxena DK, Srivastava SP. Lead and cadmium concentration in the seminal plasma of men in the general population: correlation with sperm quality. *Reprod Toxicol* 2003; 17: 447-450.
167. Sallmen M, Lindbohm ML, Nurminen M. Paternal exposure to lead and infertility. *Epidemiology* 2000; 11: 148-152.
168. Gennart JP, Buchet JP, Roels H, Ghyselen P, Ceulemans E, Lauwerys R. Fertility of male workers exposed to cadmium, lead, or manganese. *Am J Epidemiol* 1992; 135: 1208-1219.
169. Joffe M, Bisanti L, Apostoli P, Kiss P, Dale A, Roeleveld N, et al. Time To Pregnancy and occupational lead exposure. *Occup Environ Med* 2003; 60: 752-758.
170. Benoff S, Jacob A, Hurley IR: Male infertility and environmental exposure to lead and cadmium. *Hum Reprod Update* 2000; 6: 107-121.
171. Batra N, Nehru B, Bansal MP. Influence of lead and zinc on rat male reproduction at 'biochemical and histopathological levels'. *J Appl Toxicol* 2001; 21: 507-512.
172. Saxena DK, Murthy RC, Lal B, Chandra SV. Lead induced testicular changes in protein malnourished rats. *Folia Histochem Cytobiol* 1989; 27: 57-61.
173. Vaziri ND, Khan M. Interplay of reactive oxygen species and nitric oxide in the pathogenesis of experimental lead-induced hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34: 920-925.
174. Patrick L. Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Altern Med Rev* 2006; 11: 114-127.
175. Kasperczyk S, Birkner E, Kasperczyk A, Zalejska-Fiolka J. Activity of superoxide dismutase and catalase in people protractedly exposed to lead compounds. *Ann Agric Environ Med* 2004; 11: 291-296.
176. Hsu PC, Hsu CC, Guo YL. Hydrogen peroxide induces premature acrosome reaction in rat sperm and reduces their penetration of the zona pellucida. *Toxicology* 1999; 139: 93-101.
177. Marchlewicz M, Wiszniewska B, Gonet B, Baranowska-Bosiacka I, Safranow K, Kolasa A, et al. Increased lipid peroxidation and ascorbic Acid utilization in testis and epididymis of rats chronically exposed to lead. *Biometals* 2007; 20: 13-19.
178. Odenbro A, Kihlström JE. Frequency of pregnancy and ova implantation in triethyl lead-treated mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1977; 39: 359-363.
179. Wide M, Wide L. Estradiol receptor activity in uteri of pregnant mice given lead before implantation. *Fertil Steril*. 1980; 34: 503-8.
180. Taupeau C, Poupon J, Treton D, Brosse A, Richard Y, Machelon V. Lead reduces messenger RNA and protein levels of cytochrome p450 aromatase and estrogen receptor beta in human ovarian granulosa cells. *Biol Reprod*. 2003; 68: 1982-8.
181. Yoshida, M. Placental to fetal transfer of mercury and fetotoxicity. *Tohoku J. Exp. Med*. 2003; 201: 1-9.
182. Shen W, Chen Y, Li C, Ji Q. Effect of mercury chloride on the reproductive function and visceral organ of female mouse. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2000; 29: 75-77.

183. Choy CMY, Lam CWL, Cheung LTF, Briton-Jones CM, Cheung LP, Haines CJ. Infertility, blood mercury concentrations and dietary seafood consumption: a case-control study. *BJOG*. 2002; 109: 1125-1211.
184. Fateh M, Sultan K, Obasaju M, Abeyawardene S, Chan M, Khan S. Elevated blood mercury levels are associated with poor outcome in IVF cycles. *Fertil. Steril.* 2005; 84: S87.
185. Rao MV and Sharma PS. Protective effect of vitamin E against mercuric chloride reproductive toxicity in male mice. *Reprod. Toxicol.* 2001; 15: 705-712.
186. Woo AL, James PF, Lingrel JB. Sperm motility is dependent on a unique isoform of the Na-K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 20693-20699.
187. Aitken RJ, and Krause C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction.* 2001; 122: 497-506.
188. Garcia R, Martinez R, Rabago M, Hernandez-Perez O, Reyes A, Rosado A. Subcellular distribution of phospholipase A2 and ATPase during capacitation and acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *Arch. Androl.* 1991; 26: 93-105.
189. Savabieasfahani M, Lochmiller RL, Rafferty DP, Sinclair JA. Sensitivity of wild cotton rats (*Sigmodon hispidus*) to the immunotoxic effect of low level exposure. *Arch Environ Contam Toxicol.* 1998; 34: 289-296.
190. Working PK, Bus JS, Hamm TE. Reproductive effects of inhaled methyl chloride in the male Fischer rat: Spermatogonial toxicity and sperm quality. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1985; 77: 144-157.
191. John MD, Jacobson CF, Anthony RS, Craig HF, Joseph FH. An assessment of the developmental toxicity of inorganic arsenic. *Rep Toxicol* 1998; 12: 385-433.