

Üreme Üzerine Etkili GnRH Hormonu ile Aşılanmış Dişi Sıçanların Serum Makro ve Eser Element Düzeyleri

Plasma Macro and Trace Element Levels of Female Rats Vaccinated with GnRH Hormone on Reproductive

Aslı Çilingir Yeltekin^{1*}, Funda Eşki², Leyla Mis³

¹Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü, Van, Türkiye

²Çukurova Üniversitesi, Ceyhan Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Bölümü, Adana, Türkiye

³Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Bölümü, Van, Türkiye

ÖZET

Amaç: Hormonlar ile eser elementler arasında önemli bir ilişki vardır. Eser elementler konsantrasyonlarına bağlı olarak hayvan ve insan yaşamı üzerine faydalı ve zararlı etkilere sebep olabilir. Bu çalışmada, GnRH aşısı (Repro-Bloc™) uygulanan dişi sıçanların 6. ve 16. aylarına ait kan plazmalarında, makro ve eser element düzeylerindeki değişimin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 50 adet dişi Wistar Albino sıçan kullanılmıştır. Deney grubundaki her sıçana GnRH aşısından 200 µl kas içi tek doz olarak uygulanmıştır. Alınan kan plazma örneklerine gerekli işlemler uygulandıktan sonra ICP-OES (inductively-coupled plasma-optic emission spectroscopy) cihazında analiz edilerek Cu, Fe, Mn, Zn, Se, K, P, Ca, Mg elementlerinin düzeyleri tespit edilmiştir.

Bulgular: Çalışmada eser elementlerden Zn, Mn, Se düzeylerinin ilk 6 aylık süreçte, Cu, Mn düzeylerinin ise 16 aylık süreçte istatistik olarak anlamlı değişiklikler gösterdiği tespit edilmiştir (p<0.05). Makro elementlerde, ilk 6 aylık süreçte Ca, P elementleri, 16 aylık süreçte ise Ca, Mg element düzeyleri istatistik olarak anlamlı sonuç vermiştir (p<0.05).

Sonuç: Çalışmada, sıçanlara uygulanan GnRH aşısının makro element ve eser element düzeylerine etki ettiği ortaya çıkmıştır.

Anahtar Kelimeler: Eser element, Makro element, GnRH aşısı, Sıçan, ICP-OES

ABSTRACT

Objectives: There is a significant relationship between hormones and trace elements. Trace elements can cause harmful and beneficial effects on animal and human life depending on their concentrations. In this study, it was aimed to investigate the changes in macro- and trace element levels in blood plasmas of 6th and 16th months of GnRH vaccination (Repro-Bloc™) female rats.

Materials and Methods: 50 female Wistar Albino rats were used in the study. Each rat in the experimental group was administered a single 200 µl intramuscular dose of GnRH. The levels of Cu, Fe, Mn, Zn, Se, K, P, Ca, and Mg elements were determined by analyzing the collected plasma samples using inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy (ICP-OES).

Result: It was determined that zinc, manganese and selenium levels of the trace elements showed statistically significant changes in the first 6 months and Cu and Mn levels were statistically significant (p<0.05). In the macro elements, Ca, P elements in the first 6 months period and Ca and Mg element levels in 16 months period gave statistically significant results (p<0.05).

Conclusion: In the study, it was revealed that the GnRH vaccine administered to rats affected macro-element and trace element levels.

Key Words: Trace element, Macro element, GnRH vaccine, Rat, ICP-OES

Giriş

Hormonlar vücut ağırlığı, metabolizma, iştah, büyüme, gelişme ve üreme faaliyetleri gibi birçok önemli olayı etkileyen yaşamsal öneme sahip kimyasal maddelerdir. Salgı bezlerinden salgılandığı gibi diğer hücrelerden de salgılanan hormonlar genellikle kan yoluyla taşınarak etki

edeceği organlara ulaşır ve orada etkilerini gösterir. Özellikle üremede rol alan GnRH hormonu doğal olarak hipotalamustan sentezlenir ve adenohipofizden gonadotropik hormonların (FSH ve LH) sentez ve sekresyonunu uyarır. Bu nedenle bu hormon hem erkek hem de dişi üremesinde önemlidir (1).

*Sorumlu Yazar: Yard. Doç. Dr. Aslı Çilingir Yeltekin, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü, 65080/Kampüs-Van
E-mail: aslicilingir@gmail.com / aslicilingir@yyu.edu.tr

Geliş Tarihi: 31.10.2017, Kabul Tarihi: 06.11.2017

Günümüzde gerek evcil gerekse yabani hayvan sayısında istenmeyen artışlar görülmektedir. Bu nedenle etkili ve güvenli kontraseptif yöntemlerin kullanımı zorunlu hale gelmiştir (2).

Birçok hayvan sahibi istenmeyen çiftleşmelerin engellenmesinde kimyasal ajanları; güvenilirlik, etkinlik ve maliyet açısından şirurjikal yöntemlere tercih etmektedir. Bu yöntemler fertilitiyi geri dönüşümlü olarak engellemektedir.

Progesteronlar, androjenler ve Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH) analoglarının kullanımını içeren hormonal uygulamalar, ya doğrudan hormon-reseptör ilişkisini keserek ya da dolaylı olarak olumsuz geri bildirim yolu ile üremenin denetlenmesinde etkilerini gösterir (3).

GnRH hormonuna karşı geliştirilen asinine, gonadotropik hormonların sekresyonunu azaltarak veya engelleyerek etkisini gösterdiği belirtilmiştir. Gonadotropik hormonların sekresyonunun azalması veya engellenmesi gonadal dokuların atrofisine, gametogenezin inhibisyonuna ve dolayısıyla reprodüktif davranışların görülmemesine neden olmaktadır. Aşılana bir bireyin aşılama sonrası ortalama 12 ay kadar steril kaldığı ve dolaşımdaki immunglobulin seviyesinin düşmesini takiben üreme yeteneğini tekrar kazandığı ifade edilmiştir. Fertil döneme geri dönüşe izin veren immunokontraseptif aşıların etkin olduğu, sistemik yan etkisi bulunmadığı, tek uygulamada başarı sağladığı ve diğer yöntemlere kıyasla oldukça ucuz olduğu iddia edilmiştir (2).

Ağır metallerin yüksek konsantrasyonlarının tüm canlılar üzerine olumsuz etkileri olduğu bilinmesine rağmen, ağır metallerin ve eser elementlerin üreme kapasitesi üzerindeki etkileri tam olarak açıklanamamıştır (4). Eser elementler konsantrasyonlarına bağlı olarak hayvan ve insan yaşamı üzerine faydalı ve zararlı etkilere sebep olabilirler. Eser elementler, vücudumuzda sentezi mümkün olmayan, mutlaka dışarıdan alınması gereken temel besin öğeleridir. Hücre korunması, sağlıklı kemik ve cilt yapısı için önemlidir. Eser elementler aynı zamanda kan basıncı, kalp ritmi, kas fonksiyonları, vücuttaki sıvı dengesinin muhafazası, üreme ve daha pek çok fonksiyonda önemli rol oynar. Bu elementler, vücutta antioksidan olarak görev yapmaları, çeşitli enzimlerin kofaktörü olmaları ve asimilasyon işlemine katılmalarından dolayı önemlidir. Ayrıca metalloenzim ve metalloproteinlerin yapısal bileşeni olarak ve membran içinde dengeleyici olarak yer almaktadırlar (5).

Bu çalışmada; dişi sıçanlarda üremenin non-şirurjikal kontrolünde, recombinant antijenik

ovalbumin-GnRH füzyon protein molekülünün cytosine phosphodiester guanine oligodeoxynucleotide (CpG ODN) adjuvantı ile birleştirilmesi sonucunda elde edilen bir GnRH aşısı (Repro-Bloc™), uygulanan sıçanlarda 6. ve 16. aylarda makro ve eser element değişiminin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Hayvan Materyali: Çalışmanın hayvan materyalini, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinde bulunan yaklaşık 3-4 aylık, 250-300 gram ağırlığında ve gebe olmayan Wistar Albino dişi ve erkek sıçanlar oluşturmuştur. Yaklaşık 16 ay devam eden çalışmada; hayvanların yeri ve hayvan başına düşen barınma ve bakım koşulları bu üniteye uygulanan standartlara göre sağlanmıştır. Çalışmaya alınan 50 adet dişi sıçan; 35 adet deney grubu ve 15 adet kontrol grubu olarak ikiye ayrılmıştır. Çalışma için Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Yerel Etik Kurulundan 31.03.2011 tarih ve 03 sayılı kararı gereğince izin alınmıştır.

Aşının Uygulanması: Deney grubundaki her, sıçana çalışmanın başında enjektörle formdaki GnRH aşısından (ReproBloc™), 200 µl hacimde (Amplicon Vaccine, L.L.C. tarafından önerilen doz) tek doz kas içi uygulanmıştır. Kontrol grubundaki 15 sıçana da yine kas içine aşının hacmi kadar steril serum fizyolojik (pH: 7.2) enjektörle edilmiştir.

Kan Alma: Kan almadan önce periton içi Ketamin (Ketalar, PFİZER) enjeksiyonu uygulanarak genel anestezi uygulanmıştır. Anestezi sonrası sıçanların kalbinden EDTA'lı tüplere kan alınmıştır. Kan örnekleri soğutmalı santrifüjde 4 °C'de 1600 d/dk da 20 dakika santrifüj edilerek analiz için kan plazmaları ayrılmıştır. Kan alma işlemi 6. ay ve 16. aylarda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen plazmalar makro ve eser element analizleri yapıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

Biyokimyasal Çalışma: Çalışmada Papageorgiou ve ark.'nın (6) metodu bazı modifikasyonlarla kullanılmıştır. Dondurulan plazma örneklerinden 1ml cam tüplere alınarak %65'lik HNO₃ (Merck, Germany)' den %3'lük HNO₃ çözeltisi hazırlanıp 1ml eklenerek 2000-3000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Tüplerde kalan partiküller süzülerek ayrıldıktan sonra üzerine 1ml %1'lik Triton-X eklenerek deiyonize saf su ile hacim 10 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan karışımlarda Cu, Fe, Mn, Zn, Se, K, P, Ca, Mg elementlerinin düzeyleri ICP-OES (inductively-coupled plasma-optic emission spectroscopy) Thermoscientific ICAP

6000 Series) (0.005ppm detectable limit) cihazı ile analiz edilmiştir.

İstatik Analiz: Çalışmamızdaki sürekli değişkenler için tanımlayıcı istatistikler; Ortalama ve Standart Sapma olarak ifade edilmiştir. Sürekli değişkenlerin bakımından grup ortalamalarını karşılaştırmada Mann Whitney U test kullanılmıştır. Hesaplamalarda istatistik anlamlılık düzeyi %5 olarak alınmış ve hesaplamalar için SPSS (IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.) istatistik paket programı kullanılmıştır.

Bulgular

Çalışmada GnRH aşısı uygulanan dişi sıçanların ve kontrol gruplarının 6. ve 16. aylarında alınan

kanlarından elde edilen plazma örneklerinde Cu, Fe, Mn, Zn, Se, K, P, Ca, Mg elementlerinin düzeyleri belirlenmiştir.

Altıncı ayda plazma örneklerinde Mn, Zn, ve Se eser elementlerinin düzeylerinin kontrol grubuna göre istatik olarak anlamlı farklılıklar gösterdiği görülmüştür. Makro elementler olarak ise P ve Ca düzeylerinin istatik açıdan anlamlı olduğu tespit edilmiştir (Tablo 1) (Graf.1-2).

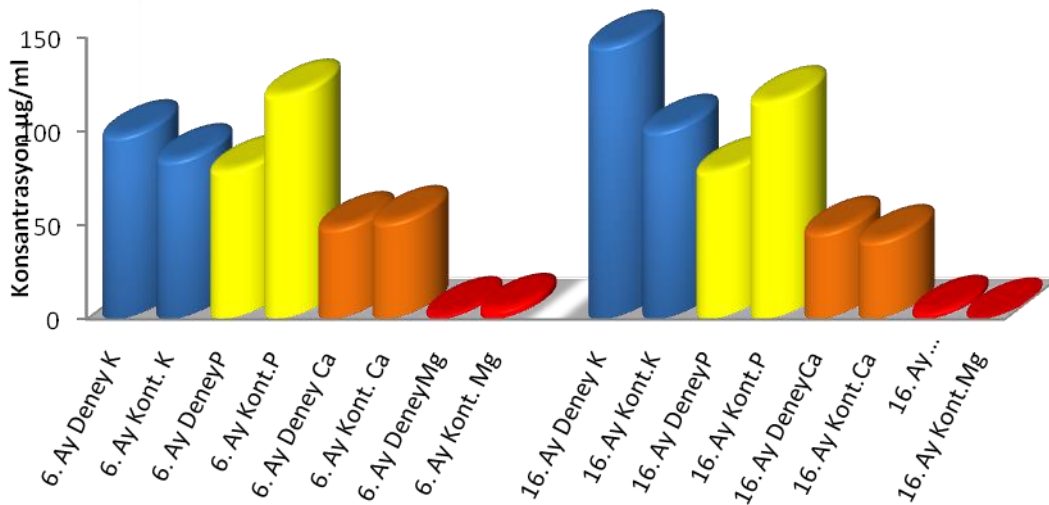
On altıncı ayda ise Cu ve Mn eser elementlerinin düzeylerinin istatik olarak farklılık gösterdiği gözlenmiştir. Makro elementlerden ise Ca ve Mg elementlerinin düzeylerinin istatik olarak farklı olduğu belirlenmiştir (Tablo 2) (Graf.1-2).

Tablo 1. Dişi sıçanların 6. ay makro ve eser element düzeyleri (µg/ml)

	Deney grubu Ort ± ss	Kontrol Grubu Ort ± ss
Eser Elementler		
Cu	0,891±0,167	1,155±0,095
Fe	1,142±0,309	5,260±0,704
Mn	0,137±0,047*	0,225±0,001*
Zn	0,163±0,119*	0,170±0,014*
Se	0,086±0,019*	0,100±0,001*
Makro Elementler		
K	97,169±17,398	84,425±0,001
P	78,493±18,992*	118,850±0,001*
Ca	48,226±6,977*	51,440±0,525*
Mg	2,028±2,209	4,642±2,095

*p<0.05

SS: Standart Sapma



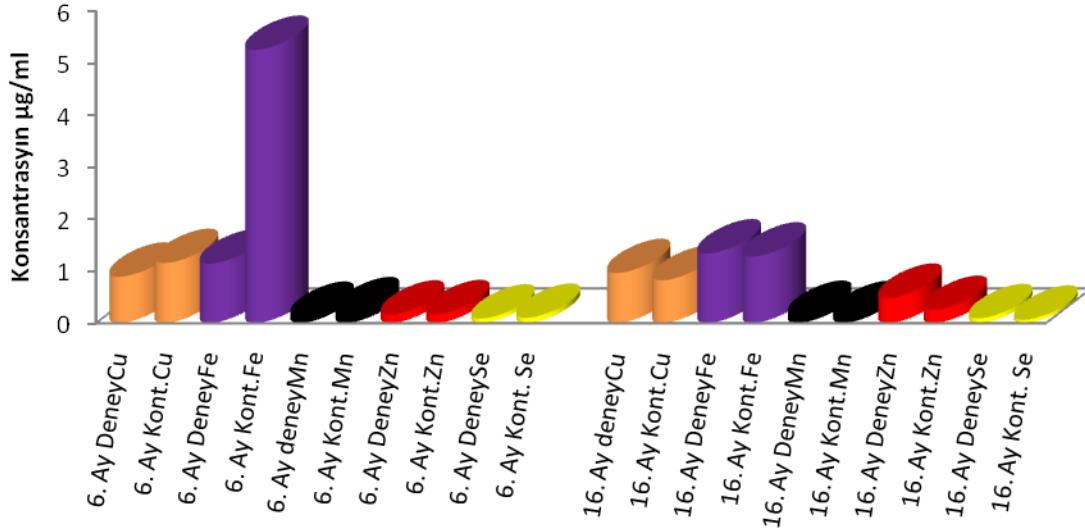
Grafik 1. Makro elementlerin 6. ve 16. aylardaki değişimi.

Tablo 2. Dişi sıçanların 16. ay makro ve eser element düzeyleri (µg/ml)

	Deney grubu Ort ± ss	Kontrol Grubu Ort ± ss
Eser Elementler		
Cu	0,962±0,242*	0,822±0,032*
Fe	1,339±0,504	1,280±0,090
Mn	0,156±0,055*	0,148±0,008*
Zn	0,485±0,802	0,251±0,215
Se	0,092±0,041	0,064±0,006
Makro Elementler		
K	145,008±163,664	100,098±3,349
P	78,064±29,138	115,359±14,212
Ca	45,866±7,294*	41,312±1,032*
Mg	3,187±2,416*	0,808±0,053*

*p<0.05

SS: Standart Sapma



Grafik 2. Eser elementlerin 6. ve 16. aylardaki değişimi.

Tartışma

Eser elementler organizmada pek çok biyokimyasal ve metabolik reaksiyonlarda yer alan ve bağışıklık sistemi için gerekli olan çok önemli elementlerdir. Hayvanların ihtiyaç duyduğu eser element gereksinimi yaş, üretim seviyesi, hamilelik ve laktasyon dönemi gibi varyasyonlarla değişim gösterir (7). Normal büyüme ve yaşamın sürekliliği için makro ve eser elementlerin organizmalarda mutlaka bulunması gerekir. Metabolizmadaki eser element düzeyi hormon sistemi için de oldukça önemlidir. Hormonlar ile eser elementler arasında önemli bir ilişki vardır. Eser elementler hem hormon metabolizmasına katılır, hem de hormon fonksiyonundaki bozukluklar eser elementlerin kan ve dokulardaki düzeylerini değiştirebilir (8).

Ergenlik dönemi öncesi süreçte bulunan bufalolara Buserelin acetate uygulanarak plazma mineral (Ca, P, Mg, Zn, Cu, Co, Fe ve Mn) düzeylerinin incelendiği bir çalışmada, sadece Cu ve Co düzeylerinin değiştiği tespit edilmiştir (9). GnRH-antagonisti ile intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu yapılan bir çalışmada serum ve foliküler sıvıda (Cd, Pb, Hg, As, Cu, Zn, Fe) element düzeyleri tespit edilmiştir. Pb'nin kan konsantrasyonları ve Cu'nun foliküler sıvı konsantrasyonlarının üreme döngüsü üzerine önemli etkilere sahip olabileceğini tespit etmişlerdir (10). Maldonado ve ark. (11), Holstein ineklerine hem eser element (Cu ve Zn) hem de GnRH enjeksiyonu yaparak ineklerin üreme ve folikül gelişiminin incelendiği çalışmada, ineklerde foliküler ve korpus luteum gelişiminde eser element enjeksiyonun gebelik

oranını artırmak için uygun bir yol olabileceği kanısına varmışlardır. Bu alanda yapılan bir diğer çalışma ise peripubertal dönemde bulunan boğalara farklı dozlarda Zn, Cu, Mn ve Co elementleri uygulanarak endokrin sistemdeki değişimler incelenmiştir. Çalışmada, her bir grupta Testosteron konsantrasyonlarında artış ve pubertal boğalarda LH oranının prepubertal boğalara göre azalmış olduğunu tespit etmişlerdir (12). Hormon metabolizmasına karşın bu eser elementlerden çinko en önemlilerinden birisidir (8). Yaptığımız çalışma da bu durumu destekler sonuçlar elde edilmiştir. GnRH aşısından sonraki 6 aylık süreçte Zn düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı düşüş gösterdiği görülmüştür ($p<0.05$). Aşının etkisi azalınca 16 aylık süreçte bu fark ortadan kalkmıştır. Bu durum literatür ile uyumlu olarak Zn elementinin üreme hormonları metabolizması üzerinde ne kadar etkili olduğunu göstermektedir. Günümüzde, çinko elementinin 300'den fazla enzimatik reaksiyon ile gen ekspresyonunda rol alan 2000'den fazla proteinin yapısında bulunduğu bilinmektedir (8).

Bakır elementi de, demir ve çinko elementinden sonra vücutta bulunan üçüncü büyük eser elementtir. Bazı hormonların aktivitesindeki değişikliklerin bakır metabolizmasını da etkilediği bilinmektedir (13). Yumurtalıklarında foliküler atrezi olan keçilerin eser element (Zn, Cu, Mn, Fe) düzeylerindeki değişikliklerin incelendiği bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada, eser elementlerin fertilité iyileştirme planında kullanılabilir temel veriler sağladığı belirtilmiştir (14). Yaptığımız çalışmada da Cu düzeyi, ilk 6 aylık aşamada daha düşük değerde iken sürecin devamında aşının etkisinin azalmasıyla artış göstermiştir. Bu durum tüm vücutta, özellikle elektron taşıma sisteminde etkili olan Cu gibi önemli bir elementin GnRH aşısının etkisiyle baskılandığını gösterebilir.

Adedara ve ark. (15) yaptığı bir çalışmada ratlara Mn ve As elementleri uygulanarak hipofiz-gonad baskılaması yapılmaya çalışılmıştır. Çalışmada tüm sıçanlarda sperm miktarında ve kalitesinde belirgin bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Erkek tavşanlara Kisspeptin uygulaması yapılarak eser element (Zn, Cu, Mn, Fe, Co) konsantrasyonları ve Testosteron salınımı arasındaki bağlantıyı belirlemek amaçlı yapılan bir çalışmada, eser elementlerin düzeylerinin korunmasının hem insan hem de hayvan doğurganlığı için ve infertilite sorunlarının tedavisinde önemli görevi olduğu görülmüştür (16). Bufalolara GnRH uygulaması yapılarak eser element (Cu, Co, Zn, Fe, Mn) düzeyleri araştırılan bir diğer çalışmada da sağlıklı

gelişim ve üreme için eser element ihtiyacını karşılamak amaçlı minerallerin, günlük beslenmede mutlaka alınması gerektiği sonucuna varılmıştır (17). Mangan, glutamin sentetaz, piruvat karboksilaz, aynı zamanda kofaktör olarak çinkoyu da kullanan superoksit dismutaz gibi enzimlerin bileşiminde bulunur. Mn içeren süperoksit dismutaz hücreyi, kimyasal maddelerin ve radyasyonun neden olduğu karsinogenesisize karşı korur. Laboratuvar hayvanlarında Mn eksikliğinde; büyüme geriliği, kemiklerde yapısal ve kimyasal anormallikler, dişilerde kısırlık ve lipit metabolizmasında bozukluklar gözlenmiştir (18). Yaptığımız çalışmada literatür ile uyumlu olarak Mn düzeyinin her iki grupta da anlamlı değişiklikler gösterdiği görülmüştür.

Doğada yaygın olarak bulunan selenyum; insan ve hayvan organizmalarının normal gelişmesi için gerekli olan esansiyel eser elementlerden birisidir. Bazı çalışmalarda hormon aktivitesindeki değişikliklerin, selenyum düzeylerinde de önemli farklılıklara yol açtığı gözlenmiştir (19). Sıçanlarda selenyum eksikliğinin testis morfolojisi ve fonksiyonu üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışma yapılmıştır. Çalışmada, testis morfolojisinin ve fonksiyonlarının selenyum eksikliğinden etkilendiği ve selenyum elementinin testosteron biyosentezi, spermatozoa oluşumu ve normal gelişimi için gerekli olduğu tespit edilmiştir (20). Pinealektomi ve melatonin uygulamasının, sıçanların kan ve çeşitli dokularındaki elementleri nasıl etkilediğinin araştırıldığı bir çalışma yapılmıştır. Çalışmada pinealektominin sıçanların kan ve çeşitli dokularında element metabolizmasını önemli şekilde bozduğu, melatonin uygulamasının ise vücut element metabolizması üzerinde düzenleyici bir etkiye sahip olabileceği gösterilmiştir (21). Yaptığımız çalışmada ise Se elementi değerinin 6 aylık süreçte düştüğü gözlenirken, 16 aylık süreçte Se değerlerinde artış gözlenmiştir. Bu durum hormon metabolizmasının Se elementi üzerine ne kadar etkili olduğunu göstermektedir.

Kalsiyum, vücutta en çok bulunan ve mutlaka alınması gereken önemli bir elementtir. Ayrıca birçok enzimin kofaktörüdür. Fosfor (P), kalsiyumdan sonra, vücutta bulunan, ikinci büyük elementtir. Fosfor; karbonhidrat, protein ve yağların metabolizmasında görevli olan makro besin ögesidir (22). Magnezyum, sinir iletimi, kas kontraksiyonu ve 300'den fazla enzimatik reaksiyona katılan bir makro elementtir (23). Magnezyum vücutta miktar bakımından dördüncü, intraselüler olarak ise potasyumdan sonra ikinci en çok bulunan katyondur. Bütün hücrelerde

bulunmakla birlikte kemikte, kasta ve yumuşak dokularda konsantrasyonu daha yüksektir (23). Miyom ve uterin kanserli hastalarda eser elementlerin dokudaki seviyeleri ile ilgili yapılan bir çalışmada. Uterin kanser dokusunda normal uterin dokuya kıyasla Ca ve Mg konsantrasyonunda anlamlı bir artış gözlenmiştir (24). Östrojen, IL 6 üzerine etki ederek osteoklastın rezorbe edeceği kemiğin derinliğini ayarlar. Aynı zamanda dolaylı yoldan vitamin D sentezini etkileyerek bağırsaktan Ca emilimini regüle etmektedir. Bu duruma paralel olarak çalışmamızda her iki grupta da Ca düzeyinin istatistik olarak kontrolden daha düşük olmasının GnRH hormonundan ne kadar etkilendiğini göstermektedir. AI + GnRH (20µg) karışımının 3 aylık süre ile ineklere uygulandığı bir çalışmada makro (Ca, P, Mg) ve mikro (Zn, Cu, Fe, Co, Mn) element düzeyleri incelenerek, sadece Zn ve Cu düzeylerinde değişim tespit edilmiştir (25). Bu veriler ışığında sunduğumuz çalışma sonuçlarının, diğer çalışma sonuçlarına göre anlamlı çıkması; takip süresinin daha uzun ve kullanılan dozun daha yüksek olmasından kaynaklanmış olabilir.

Çalışma sonucunda, tek doz GnRH aşısından sonrası 6. ayda eser elementlerden Zn, Mn, Se düzeylerinde ve 16. ayda ise Cu, Mn düzeylerinde istatistik olarak anlamlı değişiklikler gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca makro elementlerden Ca, P düzeylerinde 6. ayda, Ca, Mg element düzeylerinde ise 16. ayda istatistik olarak anlamlı sonuç vermiştir. Sonuç olarak; GnRH aşısının makro element ve eser element düzeylerine etki ettiği, uygulanan doz miktarı ve kullanım süresine bağlı olarak da hormon sistemine müdahalelerin metabolizmada uzun süreli etkilere sebep olduğunu düşünülebilir.

Kaynaklar

- Conforti VA, de Avila DM, Cummings NS, Zanella R, Wells KJ, Ulker H, et al. CpG motif-based adjuvant as a replacement for Freund's complete adjuvant in a recombinant LHRH vaccine. *Vaccine* 2008; 26(7): 907-913.
- Serin G, Serin İ. İmmunokontrasepsiyon yöntemleri 1. Zona Pellucida aşıları. *İÜ Veteriner Fakültesi Dergisi* 2005; 31(2): 133-139.
- Kutzler M, Wood A. Non-surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology* 2006; 66(3): 514-525.
- Bloom MS, Kim K, Kruger PC, Parsons PJ, Arnason JG, Steuerwald AJ, et al. Associations between toxic metals in follicular fluid and in vitro fertilization (IVF) outcomes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2012; 29(12): 1369-1379.
- Ganjavi M, Ezzatpanah H, Givianrad MH, Shams A. Effect of canned tuna fish processing steps on lead and cadmium contents of Iranian tuna fish. *Food Chem* 2010; 118: 525-528.
- Papageorgiou T, Zacharoulis D, Xenos D, Androulakis G. Determination of trace elements (Cu, Zn, Mn, Pb) and magnesium by atomic absorption in patients receiving total parenteral nutrition. *Nutrition* 2002; 18(1): 32-34.
- Hamzeh MA, Aftabi A, Mirzaee M. Assessing geochemical influence of traffic and other vehicle-related activities on heavy metal contamination in urban soils of Kerman city, using a GIS-based approach. *Environ Geochem Health* 2011; 33(6): 577-594.
- Ravaglia G, Forti P, Maioli F, Nesi B, Pratelli L, Savarino L, et al. Blood micronutrient and thyroid hormone concentrations in the oldest-old. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(6): 2260-2265.
- Dhamsaniya HB, Parmar SC, Jadav SJ, Bhatti IM, Patel VK. Plasma Minerals Profile in delayedpubertal Surti buffalo heifers treated with GnRH alone and with Phosphorus. *Journal of Livestock Science (ISSN online 2277-6214)* 7: 157-/J. *Livestock Sci* 2016; 7: 157-161.
- Tolunay HE, Şükür YE, Ozkavukcu S, Seval MM, Ateş C, Türksöy VA, et al. Heavy metal and trace element concentrations in blood and follicular fluid affect ART outcome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2016; 198: 73-77.
- Maldonado JG., Santos RR, Lara RR, Peña OG. Effect of injectable trace mineral complex supplementation on development of ovarian structures and serum copper and zinc concentrations in over-conditioned Holstein cows. *Animal Reproduction Science* 2017; 181: 57-62.
- Geary TW, Kelly WL, Spickard DS, Larson CK, Grings EE, Ansotegui RP. Effect of supplemental trace mineral level and form on peripubertal bulls. *Animal Reproduction Science* 2016; 168: 1-9.
- Zhang F, Liu N, Wang X, Zhu L, Chai Z. Study of trace elements in blood of thyroid disorder subjects before and after 131I therapy. *Biol Trace Elem Res* 2004; 97(2): 125-134.
- Bhardwaj JK, Sharma RK. Changes in trace elements during follicular atresia in goat (*Capra hircus*) ovary. *Biol Trace Elem Res* 2011; 140(3): 291-298.
- Adedara IA, Abolaji AO, Awogbindin IO, Farombi EO. Suppression of the brain-pituitary-testicular axis function following acute arsenic and manganese co-exposure and withdrawal in rats. *J Trace Elem Med Biol* 2017; 39: 21-29.
- Qureshi IZ, Abbas Q. Modulation of testicular and whole blood trace element concentrations in conjunction with testosterone release following kisspeptin administration in male rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Biol Trace Elem Res* 2013; 154(2): 210-216.

17. Soni DK, Khasatiya CT, Rede AS, Chaudhary SS. Modulation of serum trace mineral profiles in post-partum acyclic surti buffaloes with GnRHalone and in combination with vitamin A, D3, E and toldimphos sodium preparation therapy. *The Asian Journal of Animal Science* 2015; 10(2): 124-131.
18. Baysal A. Beslenme. 9. baskı. Ankara: Hatiboğlu yayınevi 2002;110-145.
19. Liu N, Liu P, Xu Q, Zhu L, Zhao Z, Wang Z, et al. Elements in erythrocytes of population with different thyroid hormone status. *Biol Trace Elem Res* 2001; 84(1-3): 37-43.
20. Behne D, Weiler H, Kyriakopoulos A. Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats. *J Reprod Fertil* 1996; 106(2): 291-297.
21. Köykun Z. Sıçanlarda Pinealektomi ve Melatonin Uygulamasının Kan ve Dokulardaki Çeşitli Element Düzeyleri Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi T.C. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Konya-2012.
22. Li L, Liu C, Lian X. Gene expression profiles in rice roots under low phosphorus stress. *Plant Mol Biol* 2010; 72(4-5): 423-432.
23. Ivy J, Portman R. *The Future of Sports Nutrition: Nutrient Timing*; anasci.org. Original Publisher's 2004; 71-79.
24. Nasiadek M, Krawczyk T, Sapota A. Tissue levels of cadmium and trace elements in patients with myoma and uterine cancer. *Hum Exp Toxicol* 2005; 24(12): 623-630.
25. Patel KR, Dhama AJ, Savalia KK, Hadiya KK, Pande AM. Influence of Mid-Cycle Pg Treatment and GnRH at AI on Plasma Minerals Profile in Conceiving and Non-Conceiving Repeat Breeding Crossbred Cows. *The Indian Journal of Field Veterinarians* 2014; 10: 86.